

**ZELLKULTURADAPTIERUNG DES HUMANEN
CORONAVIRUS OC-43 UND DESSEN
EPIZOOTIOLOGISCHE BEDEUTUNG**

CLAUS-PETER CZERNY

1986

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

ZELLKULTURADAPTIERUNG DES HUMANEN CORONAVIRUS OC-43
UND DESSEN
EPIZOOTIOLOGISCHE BEDEUTUNG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Claus-Peter Czerny
aus
Straubing

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. Dr. habil. W. Ahne

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

Zum Gedenken
an
Prof. Dr. P. A. Bachmann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554609_0019

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	Einleitung	1
B.	Schrifttum	2
1.	Vorkommen und Bedeutung menschlicher Coronaviren	2
2.	Vermehrung von HCV OC-43 in Zellkulturen	4
3.	Strukturelle und antigene Beziehungen zwischen HCV OC-43 und anderen Coronaviren	5
4.	Verbreitung von HCV OC-43	13
C.	Eigene Untersuchungen	14
1.	Material und Methoden	14
1.1.	Zellkulturen und Medien	14
1.1.1.	Menschliche Zelllinien	14
1.1.2.	Affennierenzelllinien	14
1.1.3.	Zellkulturmedien	14
1.2.	Virusmaterial	16
1.2.1.	Versuche zur Virusisolierung in HRT-18 Zellen	16
1.2.2.	Versuche zur Virusvermehrung in Babymäusen	16
1.3.	Zellkulturadaptierung von HCV OC-43	17
1.4.	Hämagglutinationstest (HA)	18
1.5.	HämadSORPTIONstest (HAD)	18
1.6.	Bestimmung der Virusinfektiosität	19
1.7.	Erstellung einer Virusvermehrungskurve	19
1.8.	Reinigung von HCV OC-43	20
1.9.	Elektronenmikroskopische Untersuchung	21
1.10.	Serologische Untersuchungen	21
1.10.1	Gewinnung von antikörperhaltigem Mäuseaszites	21
1.10.2	Herstellung eines Immunserums gegen HCV OC-43	22
1.10.3	Serumproben verschiedener Spezies	23
1.10.4	Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	24

	Seite
1.10.5. Neutralisationstest (NT)	25
1.11. Herstellung monoklonaler Antikörper	26
1.11.1. Immunisierung der Mäuse	26
1.11.2. Zellfusion	26
1.11.3. Nachweis von Coronavirus-Antikörpern	27
1.11.4. Isolierung von Coronavirus-Antikörper-produzierenden Hybridomas	28
1.11.5. Klonierung	28
1.11.6. Produktion von Aszites	28
1.11.7. Wiederanzüchtung der im Aszites enthaltenen Hybridomas in Zellkultur	29
 2. Ergebnisse	 30
2.1. Virusisolierung	30
2.2. HCV OC-43-Vermehrung in Babymäusen	30
2.3. Adaptierung der Virusisolate an Zellkulturen	30
2.4. Vermehrungskurve von HCV OC-43	36
2.5. Untersuchungen über die Spezifität des Hämagglutinins von HCV OC-43 mit Erythrozyten verschiedener Spezies	40
2.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	41
2.7. Epizootiologische Untersuchungen über das Vorkommen von HCV OC-43-Antikörpern in Serumproben verschiedener Spezies	42
2.8. Antigenetische Beziehung zwischen HCV OC-43 und BCV	53
2.9. Versuche zur Herstellung monoklonaler Antikörper	56
 D. Besprechung der Ergebnisse	 58
 E. Zusammenfassung	 67
 F. Literaturverzeichnis	 71

A. Einleitung

Viren, die der Familie Coronaviridae zuzuordnen sind, wurden bei Tierspezies, sowie beim Menschen, als Erreger ganz unterschiedlicher Krankheitsbilder nachgewiesen.

Diese Viren galten bisher als streng speziesspezifisch. In seroepizootiologischen Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, daß bei einzelnen Haustierspezies und auch beim Menschen Antikörper gegen Coronaviren anderer Spezies vorkommen. Beim Menschen werden häufig hohe Antikörpertiter gegen das bovine Coronavirus (BCV) gefunden.

Die Bedeutung solcher Antikörper läßt sich aber nur dann richtig einschätzen, wenn man auch die Antikörpertiter gegen humane Coronaviren kennt.

Das vom Menschen isolierte Coronavirus HCV OC-43 ließ sich in Zellkulturen nur mühsam vermehren. Serologische Untersuchungen waren deshalb schwierig.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es daher, HCV OC-43 an ein geeignetes Zellkultursystem zu adaptieren. Außerdem sollten Seren verschiedener Spezies auf das Vorkommen von Antikörpern gegen HCV OC-43 untersucht werden. Schließlich wurde versucht monoklonale Antikörper gegen Coronaviren herzustellen und auf ihre Eignung zur antigenetischen Differenzierung der Coronaviren zu überprüfen.

B. Schrifttum

1. Vorkommen und Bedeutung menschlicher Coronaviren

Über die humanen Coronaviren war lange Zeit nur wenig bekannt, obwohl sie bereits 1960 in Organkulturen erstmals isoliert worden waren (Tyrrell und Bynoe, 1965). Da diese humanen Coronaviren aber nur schwer in vitro vermehrt werden konnten, gestaltete sich ihr Studium als sehr schwierig (Pokorný et al., 1975).

Aufgrund morphologischer, biochemischer und biologischer Eigenschaften gehören die menschlichen Coronaviren zur Familie der Coronaviridae. Es handelt sich um pleomorphe, im allgemeinen aber kugelförmige Partikel mit helikaler Symmetrie. Ihr Durchmesser beträgt 60-220 nm (Bingham und Almeida, 1977; Pensaert und Calebaut, 1978). Ihre Lipidhülle trägt keulenförmige Oberflächenprojektionen von ca. 20 nm Länge (Siddell et al., 1982), die eine blütenblattähnliche Morphologie zeigen (Caul und Egglestone, 1977).

Die humanen Coronaviren bestehen aus RNS, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden (Tyrrell et al., 1978). Die Dichte intakter Partikel liegt im Saccharosegradienten bei 1,18 - 1,20g/cm³ (Robb und Bond, 1979), im CsCl-Gradienten bei 1,23 - 1,24g/cm³. Die menschlichen Coronaviren sind gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen sehr labil. Sie werden bei 37°C rasch inaktiviert, sie sind empfindlich gegenüber Säure und UV-Licht, sowie Äther- und Chloroformbehandlung (Kaye et al., 1969, 1970; Bucknall et al., 1972b).

Vier wichtige Vertreter der humanen Coronaviren sind Erreger milder Erkrankungen des oberen Respirationsapparates. Der Stamm B814 war das erste menschliche Coronavirus, das entdeckt wurde. 1960 konnte er in humanen, fetalen Tracheaorgankulturen isoliert werden und schien mit den bekannten Myxo- und Paramyxoviren nicht verwandt zu sein (Tyrrell und Bynoe, 1965). Stamm 229E wurde 1962 in humanen, fetalen Nierenzellkulturen isoliert (Hamre und Procknow, 1966). Stamm OC-43 und eine Reihe verwandter Stämme wurden 1966 mittels Organkulturtechniken isoliert (McIntosh et al., 1967a). Der Stamm 692 wurde 1966 durch

Immunelektronenmikroskopie identifiziert (Kapikian et al., 1973).

Caul et al. beschrieben 1975 Coronavirus-ähnliche Partikel in Fäzes von Erwachsenen und Kindern. Diese Partikel wurden bei Individuen gefunden, die an Gastroenteritis litten, oder aber gesund waren, und aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Pleomorphie, Hüllenprojektionen) als Coronaviren identifiziert (Macnaughton und Davies, 1981). Neben zahlreichen Mißerfolgen wurde auch die erfolgreiche Adaptierung solcher Viruspartikel an humane, fetale Intestinalorgankulturen (Caul und Clarke, 1975; Caul und Egglestone, 1977), sowie an die humane Rektaltumorzelllinie HRT-18 (Laporte und Bobulesco, 1981) berichtet. Kritiker (Macnaughton und Davies, 1981) halten diesen Ergebnissen allerdings entgegen, daß jene Coronavirus-ähnlichen Partikel keine enge strukturelle Beziehung zu den Coronaviren aufweisen, daß keine biochemischen oder antigenen Studien durchgeführt worden seien, und die Organ- bzw. Zellkulturadaptierung der Bestätigung bedarf.

In neueren Untersuchungen wurde berichtet, daß humane, enterale Coronavirusstämme mit dem bovinem Coronavirus nahezu identisch sein sollen (Vautherot und Laporte, 1983). Gerna et al. (1984) finden aber eine engere Verwandtschaft dieser Viren mit HCV OC-43, als mit BCV.

Coronavirus-ähnliche Partikel wurden auch bei Patienten mit Hepatitis, malignem Lymphom, multipler Sklerose und Balkan-Nephropathie bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet, ohne daß sie als Ursache dieser Krankheiten verantwortlich gemacht werden konnten (Macnaughton et al., 1981). Gerdes et al. (1981a,b) berichteten außerdem über die Isolierung zweier Coronavirusstämme aus Gehirnen von an multipler Sklerose gestorbenen Patienten.

Im Folgenden wird auf HCV OC-43 näher eingegangen und seine Stellung innerhalb der Coronaviridae dargestellt.

2. Vermehrung von HCV OC-43 in Zellkulturen

HCV OC-43 konnte nach der Isolierung in Organkulturen durch intracerebrale Infektion in Babymausgehirnen vermehrt werden (McIntosh et al., 1967b). Organkulturen und die Passage in Babymausgehirnen stellten für viele Labors lange Zeit die einzige Möglichkeit dar, Virus für weitergehende Untersuchungen zu produzieren.

Brucková et al. (1970) berichteten über die erfolgreiche Adaptierung von HCV OC-43 aus Babymausgehirnsuspensionen an primäre Meerkatzen- und Rhesusaffennierenzellkulturen. Der Virusvermehrung lief ab der 2. bis 3. Passage ein cytopathischer Effekt parallel. Versuche zur direkten Virusisolierung in primären, humanen, fetalen Nierenzellen, in diploiden, humanen, fetalen Darmzellkulturen, in WI38-, BSC-1-, Vero- und L132-Zellen verliefen negativ, dagegen vermehrte sich das an primäre Affennierenzellen adaptierte Virus in BSC-1-Zellen ab der 1. Passage mit cpE. Dieser Stamm konnte später auch mit Erfolg auf humane, fetale Nierenzellkulturen, humane, fetale Darmzellen und WI38-Zellen übertragen werden (Kapikian et al., 1972). Der Virusnachweis erfolgte durch Beobachtung des cpE und die HämadSORptionstechnik mit Ratten- und Mäuseerythrozyten.

Schmidt et al. (1979) fanden für den BSC-1-zellkulturadaptierten HCV OC-43-Stamm zwei weitere geeignete Zelllinien. In bei 33°C im Rollerapparat bebrüteten humanen, diploiden, fetalen Tonsillenzellen (FT) entwickelte sich im Verlauf einiger Passagen ein cpE, der nach 3 Tagen auftrat und in Anschwellung und Vakuolisierung der Zellen bestand. Nach Inokulation von humanen, heteroploiden Rhabdomyosarkomazellen (RD) mit Material aus infizierten FT-Zellsuspensionen konnten 10-15fach höhere Virustiter als in FT-Zellen erzielt werden. Virusplaques wurden nach Anfärben des Zellrasens mit Kristallviolett (FT) oder Neutralrot (FT, RD) sichtbar gemacht.

Gerna et al. (1979) erzielten bei der HCV OC-43-Isolierung aus Mäusegehirnsuspensionen mit primären Nierenzellen von grünen

Meerkatzen ähnlich gute Ergebnisse wie Brucková et al. (1970). Ab der 6. Viruspassage wurde in den bei 33°C bebrüteten Kulturen erstmals HA-Aktivität im Medium festgestellt. Eine direkte Virusisolierung in BSC-1-, Verozellen, sowie einigen humanen, fetalen Lungenfibroblasten-Linien gelang ebenfalls nicht. Erst nach der Adaptierung an primäre Meerkatzennierenzellen war eine Vermehrung von HCV OC-43 auch in den Lungenfibroblasten möglich. Am besten eignete sich dabei die Linie MA-321, mit der Infektiositätstiter von $10^6 - 10^7$ KID₅₀/ml erreicht wurden. Mit diesem Material konnte HCV OC-43 später auch an Verozellen adaptiert werden (Gerna et al., 1982). Die Bebrütungstemperatur betrug ebenfalls 33°C.

Hogue et al. (1984) berichteten, daß sie HCV OC-43 sehr einfach in humanen Rektaltumor-Zellen (HRT-18) vermehren konnten, wie dies vorher schon von Vautherot und Laporte (1983) erwähnt worden war. Es war keine Adaptierung notwendig, die Inkubationszeit des Inokulums betrug 90 Minuten bei 37°C.

Im Rahmen von Untersuchungen über den Neurotropismus von OC-43, wiesen Pearson und Mims (1985) an Nervenzellkulturen nach, daß Neurone von Dorsalwurzelganglien der Maus Virusantigen und infektiöse Viruspartikel produzierten. Astrozyten und Fibroblasten produzierten nur Virusantigen, während in Oligodendrozyten kein Virus nachgewiesen werden konnte. Der Virusnachweis wurde durch Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

3. Strukturelle und antigene Beziehungen zwischen HCV OC-43 und anderen Coronaviren

HCV OC-43 war sehr häufig in Untersuchungen mit einbezogen worden, die der Klassifizierung der morphologisch relativ einheitlichen Coronaviren aufgrund struktureller und antigenener Gemeinsamkeiten dienen sollten.

McIntosh et al. (1969) führten Vergleichsuntersuchungen mit den in Organkulturen vermehrten humanen Stämmen B814, OC-16, OC-37, OC-38, OC-43, OC-44 und OC-48, dem zellkulturadaptierten humanen Stamm 229E, den Mäuse-Hepatitis-Virusstämmen MHV A-59, MHV-1,

MHV-S und IHM, sowie dem Infektiösen-Bronchitis-Virusstamm IBV-42 durch. Mittels Neutralisationstest (NT), Komplement-bindungsreaktion (KBR) und Immunfluoreszenzfärbung konnte eine antigene Verwandtschaft zwischen HCV OC-43, HCV OC-38, HCV OC-44 und den MHV-Stämmen ermittelt werden.

Kaye und Dowdle (1969) bestätigten die sehr enge Beziehung zwischen HCV OC-43 und HCV OC-38 in der Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH), KBR und im NT. Sie vermuteten, daß beide Stämme identisch seien. In ihren weiteren Versuchen reagierte nur MHV-Antiserum mit HCV OC-43, nicht aber umgekehrt.

Brucková et al. (1970) wiesen in der Komplementbindungsreaktion mit Hyperimmunseren gegen verschiedene MHV-Stämme eine geringgradige Antigenverwandtschaft mit HCV OC-43 nach.

Bradburne (1970) verglich die humanen Coronavirusstämme OC-43, LP und 229E, sowie MHV-3 und IBV im Gel-Diffusions-Test, NT, der KBR und HAH. Aus den Ergebnissen der beiden letzten Testsysteme ließ sich die Existenz gemeinsamer antigener Determinanten bei HCV OC-43 und MHV-3 ableiten. Die beschriebene Kreuzneutralisation zwischen HCV 229E und HCV OC-43-Immunseren wurde später mehrfach widerlegt und muß als falsch betrachtet werden.

Ausführliche Studien über die Proteinzusammensetzung von Babymausgehirn-adaptiertem HCV OC-43, wurden erstmals von Hierholzer et al. (1972) durchgeführt. Immundiffusion und Immunelektrophorese ergaben eine Präzipitationsbande mit nicht infiziertem Mäusegehirn, drei Banden mit hochgereinigtem Virus und vier Banden mit ungereinigtem Virus, wenn Antiseren verschiedener Spezies (Maus, Meerschweinchen, Huhn) gegen das hochgereinigte, bzw. ungereinigte Virus eingesetzt wurden. Die Autoren schlossen daraus die Vergesellschaftung eines Wirtszellantigens mit dem Virion, was durch HAH und KBR bestätigt wurde.

Nach Auftrennung der Proteinuntereinheiten des gereinigten Virus wurden mindestens sechs Polypeptide nachgewiesen. Die geschätzten Molekulargewichte betrugen 191.000, 104.000, 69.000, 47.000,

30.000 und 15.000 Daltons. Gelegentlich wurde eine siebente Bande in der Region von 165.000 Daltons gefunden. Nach Bromelinverdauung der Hüllenprojektionen waren die beiden Glykoproteine von 104.000 und 15.000 Daltons nicht mehr nachzuweisen. Die übrigen Polypeptide schienen mit Strukturkomponenten vergesellschaftet zu sein.

Auch innerhalb der, von Menschen isolierten Coronaviren, wurde nach Gemeinsamkeiten und serologischen Unterschieden gesucht. Monto und Rhodes (1977) fanden mit der Immunfluoreszenztechnik keine Verwandtschaft zwischen HCV OC-43 und HCV 229E.

Kaye et al. (1977) untersuchten HCV OC-43 und das Hämagglutinierende Encephalomyelitisvirus der Schweine (HEV 67N) in der HAH, KBR und dem NT mit Mäuse-Immunseren bzw.-Hyperimmunseren. In allen Testsystemen war eine Kreuzreaktion abzulesen. HEV-Immunserum reagierte dabei gegen HCV OC-43 mit 2-4fach höheren Antikörpertitern als umgekehrt.

Mit Hilfe der direkten und indirekten Immunfluoreszenz studierten Pedersen et al. (1978) die Antigenbeziehungen zwischen HCV OC-43, MHV-3, HEV 67N, BCV, HCV 229E, dem Felinen Infektiosen Peritonitis-Virus (FIPV), dem Übertragbaren Gastroenteritis-Virus der Schweine (TGEV) und dem Caninen Coronavirus (CCV). Das HCV OC-43-Antigen reagierte deutlich mit MHV-Antiserum und mittelgradig mit BCV-, sowie HEV 67N-Antiseren. Das HCV OC-43-Antiserum fluoreszierte kräftig mit MHV und HEV 67N, aber nur mittelgradig mit BCV. Mit den übrigen Coronaviren zeigte HCV OC-43 keine serologische Reaktion.

Schmidt et al. (1979, 1981, 1982, 1984) charakterisierten in mehreren Untersuchungen die beiden humanen Stämme OC-43 und 229E. Im Plaquereduktionstest fanden sie keine antigenen Gemeinsamkeiten. Anschließend zeigten die Autoren durch SDS-Gel-Elektrophorese, daß beide Virusstämme je drei Polypeptide der Größenklasse ≈ 180.000 , ≈ 50.000 und ≈ 23.000 Daltons besaßen, ähnlich wie andere Coronaviren auch. In der zweidimensionalen

Immunelektrophorese mit monospezifischen Antiseren gegen die einzelnen Polypeptide war keine Kreuzreaktion zwischen den beiden Stämmen festzustellen. Monospezifische Antiseren mit neutralisierender Aktivität reagierten wie humane Seren, die neutralisierende und komplementbindende Antikörper besaßen, mit dem HCV OC-43-Polypeptid von 190.000 Daltons. Dieses in der Hülle lokalisierte, glykosylierte Antigen war zugleich die Komponente mit der größten Immunogenität.

Die Polypeptide von HCV OC-43 und 229E besitzen zwar sehr ähnliche Molekulargewichte, sie sind aber immunologisch eindeutig verschieden. Dies wurde auch durch den Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestätigt. Homologe Kaninchen-Immunsere, die gegen das ganze Virus hergestellt worden waren, reagierten mit jeder der Subkomponenten, während Immunsere gegen die entsprechende Untereinheit eben auch nur diese erkannten. Kreuzreaktionen traten ebenfalls nicht auf.

In Probandenseren wurden zusätzlich spezifische Antikörper gegen Nukleokapsid- und Membranantigene gefunden, die einen signifikanten Anstieg zeigten, wenn gereinigte Virussubkomponenten als Antigen verabreicht wurden.

Zwei antigene Gruppen humaner Coronaviren beschrieben auch Macnaughton et al. (1981). Sie untersuchten Serumpaare von Probanden, die mit 10 verschiedenen humanen Coronavirusstämmen infiziert worden waren, im ELISA-Test gegen HCV OC-43, HCV 229E und zwei weitere humane Coronavirusstämmen. Ihre Ergebnisse zeigten, daß die getesteten Virusstämmen zu einer HCV OC-43-Gruppe und zu einer HCV 229E-Gruppe zusammengefaßt werden können. Die Reaktion der gleichen Seren mit MHV-3 bestätigte dessen Beziehung zu HCV OC-43.

Gerdes et al. (1981 a, b) isolierten aus frischen Gehirnen von zwei an multipler Sklerose gestorbenen Patienten die beiden Coronavirusstämmen SK und SD, und vermehrten sie in Mäusezelllinien. In einem kompetitiven ELISA-Test wurde SK-Antiserum an HCV OC-43-, SD- und MHV-59-Antigen graduell schwächer gebunden, als an das

homologe Antigen. Im Plaque-Neutralisationstest wurde zwischen den isolierten Stämmen und HCV OC-43- und MHV-A59-Antiseren eine signifikante Kreuzreaktion gefunden, dagegen nur eine schwache mit MHV-IHM-Antiserum. SK- und SD-Antiseren wirkten gegen HCV OC-43 nicht hämagglutinationshemmend. Spezifische virale Polypeptide mit gemeinsamen antigenen Determinanten, konnten ferner durch Immunopräzipitation von S^{35} -Methionin-markierten infizierten Zellextrakten identifiziert werden. SD- und SK-Polypeptide von ähnlichem Molekulargewicht wurden von SD-, SK-, OC-43- und MHV-A59-Antiseren präzipitiert. HCV 229E reagierte in diesen Untersuchungen ebenfalls nicht.

Gerna et al. (1981) untersuchten die Antigenverwandtschaft von HCV OC-43 und BCV. Dazu stellten sie Mäuse-Immunserum gegen die beiden Virusstämme her. Als Immunogen dienten jeweils infizierte Mäusegehirnsuspensionen. Durch die indirekte Immunoperoxidase-Antikörper-Technik (IPA), die HAH und einen Plaque-Reduktionstest (Gerna et al., 1980) wiesen die Autoren eine Kreuzreaktion zwischen HCV OC-43 und BCV nach. Die Ähnlichkeit interner Antigene (IPA) schien dabei größer zu sein, als die von Oberflächenantigenen (HAH, NT).

In weiterführenden Untersuchungen wurde mit der indirekten Immunofluoreszenz-Technik gezeigt, daß mit HCV OC-43 oder mit BCV infizierte Zellkulturen stark kreuzreagierende, membranassoziierte Antigene (MAA) besaßen (Gerna et al., 1982). Diese erschienen erstmals 3 Stunden p. inf. zusammen mit dem Auftreten zytoplasmatischer Antigene. Mit der IPA-Technik fand man, daß die MAA hauptsächlich aus einer stark gefärbten, diskontinuierlichen, bürstenartigen Schicht aus amorphem Material bestanden, dicht mit der infizierten Zellmembran verbunden.

Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen den BCV-Stamm G110 zusammen mit indirekter Immunofluoreszenz-Färbung wurde die Existenz gemeinsamer antigenen Determinanten bei HCV OC-43, BCV und HEV bestätigt (Vautherot und Laporte, 1983). Interessant ist die Tatsache, daß das humane enterale Coronavirus (HECV) in

diesen Untersuchungen viel näher mit BCV, wenn nicht sogar identisch ist, als mit HCV OC-43, während Gerna et al. (1984) nach serologischen Untersuchungen eher eine Beziehung zu HCV OC-43, als zu BCV nachwiesen.

In ihren Studien mit HCV OC-43, BCV und MHV-A59 setzten Hogue et al. (1984) die Immunoblotting-Technik ein. BCV wurde durch die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in vier Polypeptid-untereinheiten aufgetrennt, nämlich in ein Glykoprotein von 190.000 Daltons (meist als Subkomponenten von 120.000 und 100.000 Daltons anwesend), in ein Glykoprotein von 140.000 Daltons, in ein Phosphoprotein von 52.000 Daltons und in ein Glykoprotein von 26.000 Daltons. Gegen jede der vier Untereinheiten wurden monospezifische Antiseren hergestellt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von HCV OC-43 und MHV-A59 wurde durch Einsatz dieser Antiseren beim Immunoblotting bewiesen, daß HCV OC-43 zu jedem der vier Polypeptide die antigenetisch homologe Ergänzung mit ähnlichem Molekulargewicht besitzt. MHV-A59 hatte nur drei gemeinsame Untereinheiten. Ein Homolog zu dem vermutlichen Hämagglutinin gp 140.000 fehlte. Die Autoren weisen außerdem darauf hin, daß auch HEV A67 ein ähnliches Glykoprotein besitzt und sie vermuten, daß gp 140.000 ein Polypeptid darstellt, welches MHV-A59 im Laufe der Evolution verlorenging.

BCV und HCV OC-43 konnten strukturell durch den Unterschied im elektrophoretischen Verhalten von gp 190.000, an der Menge des gp 140.000 und an einer leichten Differenz im Molekulargewicht des internen Phosphoproteins erkannt werden. Diese Differenzen sind, wie auch die neuesten Untersuchungen zeigen (Lapps und Brian, 1985), mit einem ca. 4%-igen Unterschied in der Nukleotidsequenz der beiden Virusstämme verbunden.

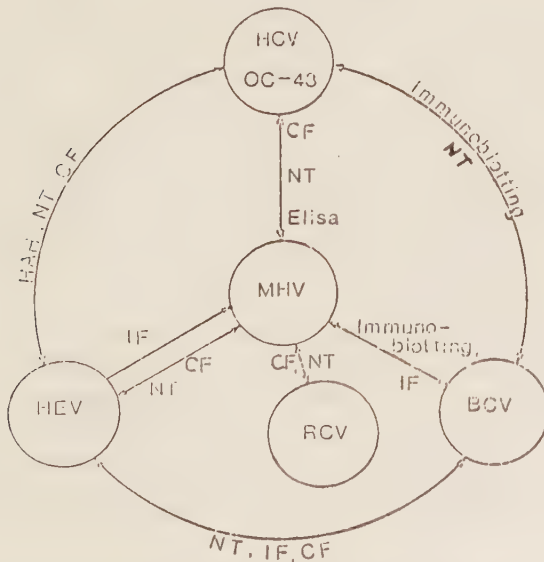
Aufgrund dieser Ergebnisse und solcher, die bei Untersuchungen, in die HCV OC-43 nicht einbezogen worden war, mit Hilfe des NT, der HAH, der Immunofluoreszenz (IF), der Immunelektronenmikroskopie (IEM) und des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

gewonnen wurden, teilte man die Mitglieder der Coronaviridae in vier selbständige antigene Gruppen ein.

Dabei ist HCV OC-43 mit dem Mäuse-Hepatitis-Virus, dem bovinen Coronavirus, dem Hämagglutinierenden Encephalomyelitis-Virus der Schweine und dem Rattencoronavirus in der Gruppe I zusammengefaßt.

Eine Übersicht dieser Klassifizierung mit den jeweils wichtigsten Vertretern bietet die Tabelle 1. Die Abbildung 1 zeigt die derzeit bekannten antigenen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gruppe I.

Abbildung 1: Antigenverwandtschaft bei Coronaviren der Gruppe I
(dargestellt nach Zink, 1985)



CF = Komplementbindungsreaktion, Elisa = Enzyme-linked immuno-sorbent essay, HAH = Hämagglutinationshemmungstest, IF = Immuno-fluoreszenz, NT = Neutralisationstest

Tabelle 1: Klassifizierung der wichtigsten bisher bekannten
Coronaviren

SÄUGETIER-CORONAVIREN

Antigene Gruppe I

Mäuse-Hepatitis-Virusstämme (MHV)

Humanes Coronavirus, Stamm OC-43 (HCV)

Bovines Coronavirus (BCV)

Hämagglutinierendes Encephalomyelitis-Virus der Schweine (HEV)

Rattencoronavirus (RCV)

Antigene Gruppe II

Übertragbares Gastroenteritis-Virus der Schweine (TGEV)

Felines Infektiöses Peritonitis-Virus (FIPV)

Canines Coronavirus (CCV)

Humanes Coronavirus, Stamm 229E (HCV)

Das Epizootische Virusdiarrhoe-Virus der Schweine (EVD) ist mit keinem der Viren der Gruppen I und II verwandt und stellt vermutlich eine eigenständige Gruppe dar.

GEFLÜGEL-CORONAVIREN

Antigene Gruppe III

Infektiöses Bronchitis-Virus der Hühner (IBV)

Antigene Gruppe IV

Virus der übertragbaren Enteritis der Puten (Bluecombvirus)

4. Verbreitung von HCV OC-43

Sarateanu und Ehrengut untersuchten 1975 in einer seroepidemiologischen Studie die Verbreitung von HCV OC-43-Antikörpern unter der Hamburger Bevölkerung. Zum Antikörpernachweis diente die Hämagglutinationshemmungsreaktion. Die Altersgruppe von 15-24 Jahren wies die weiteste Verbreitung mit 52,8% Antikörperträgern auf. Die 0-14 Jährigen folgten mit 36,2%, während bei den übrigen Altersgruppen wesentlich weniger Antikörperträger ermittelt wurden (über 60 Jahre 16,8% und 25-59 Jahre 14,4% positive Seren).

Auch für die Verbreitung von HCV OC-43 in den USA liegen Ergebnisse vor. McIntosh et al. (1974) untersuchten mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion Kinderseren. Sie fanden bei 47% der Seren von Kindern im Alter zwischen fünf und sechs Jahren Antikörper gegen HCV OC-43. Zuvor stellten schon Kaye et al. (1970, 1971) bei 36% der Kinder eine Serokonversion fest. In einer weiteren Studie untersuchten Kaye et al. (1977) 1416 humane Seren mittels KBR, HAH und NT auf das Vorkommen von HCV OC-43-Antikörpern. Durchschnittlich 27% der Seren waren positiv, eine Abhängigkeit von Alter und Beruf war nicht festzustellen. Den niedrigsten Prozentsatz hatten Fleischpacker (14%), den höchsten Hochschulstudenten (67%). Dieses Ergebnis deutete auf eine relativ breite Streuung von HCV OC-43 in der amerikanischen Bevölkerung hin.

Hovi et al (1979) führten in Finnland bei Kindern unterschiedlicher Altersgruppen mit Hilfe der KBR, HAH und dem Radio-Immunoassay eine seroepidemiologische Studie durch. Seren von Kindern unter 23 Monate waren frei von Antikörpern, anschließend stieg der Prozentsatz der Antikörperträger rasch an und ab dem sechsten Lebensjahr hatten alle untersuchten Seren HCV OC-43-Antikörper.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Zellkulturen und Medien

Zur Virusadaptierung und -züchtung wurden eine permanente menschliche, sowie mehrere Affennierenzelllinien benutzt. Des weiteren standen primäre fetale humane Lungenzellen zur Verfügung.

1.1.1. Menschliche Zelllinien

Die permanente Humane Rektaltumor Zelllinie (HRT-18), die uns freundlicherweise Herr Dr. M. Dauvergne (Institute Merieux, Lyon, Frankreich) zur Verfügung stellte, wurde ab der 30. Passage verwendet. Primäre humane embryonale Lungenzellen (HEL) wurden uns von Dr. Büttner im Institut überlassen und ab der 13. Passage eingesetzt.

1.1.2. Affennierenzelllinien

Es wurden die Vero-Zelllinie ab der 132. Passage (American Type Culture Collection Nr. CCL 22), die MA-104 Zelllinie ab der 90. Passage (Herkunft: Dr. E. Bohl, Wooster, Ohio, USA) und die BSC-1 Zelllinie ab der 57. Passage (Herkunft: Prof. ter Meulen, Würzburg) ausgewählt.

1.1.3. Zellkulturmedien

Die HRT-18-Zelllinie wurde anfangs in RPMI-1640-Medium (Biochrom, Berlin), das 10% fetales bovines Serum (FBS) enthielt, gezüchtet. Ab der 40. Passage erfolgte die kontinuierliche Umstellung auf Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen (EMEM, Biochrom, Berlin). Es wurde ebenfalls 10% FBS zugesetzt. Die HEL-Zellen wurden in EMEM und 7% FBS vermehrt.

Die Vero- und die BSC-1 Zelllinien erhielten EMEM mit 5% FBS.

Die MA-104 Zelllinie wurde in EMEM mit 5% FBS und Zugabe von nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA, Biochrom, Berlin) gezüchtet.

Die HRT-18- und die HEL-Zellen wurden alle drei Tage 1:2 geteilt, die Affennierenzellen 1:3.

Zur Zellkulturadaptierung von HCV OC-43 enthielt nur das Erhaltungsmedium der HRT-18-Zellen 1% FBS, bei den übrigen Zelllinien wurde auf die Zugabe von FBS verzichtet.

Allen Medien waren 100.000 IE/l Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugesetzt.

Die HRT-18-Zellen waren wegen möglicher Kontamination mit Mykoplasmen dreimal mit Tiamulin (Tiamulintetrahydrofumarat, TAD GmbH, Cuxhaven) in einer Konzentration von 10 µg/ml behandelt worden.

Um den Einfluß von Trypsin auf die Virusvermehrung zu untersuchen, wurde vor der Infektion jeweils die Hälfte der Zellkulturen mit Medium gewaschen, dem Trypsin in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml zugesetzt worden war. Genauso wurden 50% der als Kontrolle dienenden nicht infizierten Kulturen behandelt. Hierzu wurde aus kristallinem Trypsin (aus bovinem Pankreas, Fa. Boehringer, Mannheim) eine Stammlösung von 1 mg/ml EMEM hergestellt. Diese wurde nach Sterilfiltration mit einem Millex^R-GS Filter der Porenweite 0,22 µm bei -70°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde die Stammlösung 1:400 mit EMEM ohne Zusätze verdünnt.

1.2. Virusmaterial

Als Ausgangsmaterial diente eine von Dr. Tyrrell (Clinical Research Centre, Harrow, Middlesex, England) zur Verfügung gestellte Mäusegehirnsuspension des nicht zellkulturadaptierten HCV OC-43 Stammes (V 7387).

1.2.1. Versuche zur Virusisolierung in HRT-18 Zellen

Im Rahmen der Routinediagnostik am Institut wurde versucht, das aus England stammende Material auf der HRT-18 Zelllinie anzuzüchten (Diagnostiknummer V 997/84).

Nach der Adsorption von je 0,1 ml des Virusmaterials in drei Zellkulturröhrchen über eine Stunde, wurden nach Waschen des Zellrasens pro Röhrchen 1,5 ml RPMI 1640 mit 1% FBS hinzugefügt und 4 Tage stationär bei 37°C bebrütet. Auf die gleiche Weise wurden drei Subkultivierungen durchgeführt. Das jeweilige Zellkulturmaterial wurde einmal gefriergetaut (-70°C/25°C), gepoolt und auf neue Röhrchen weiterverimpft. Der Zellrasen wurde anhand der Ausbildung eines cytopathischen Effektes beurteilt. Im Anschluß an jede Passage wurde der Hämagglutinationstiter des gefriergetauten Materials bestimmt.

1.2.2. Versuche zur Virusvermehrung in Babymäusen

Das Virusausgangsmaterial, sowie die Isolierung und die erste Subkultivierung auf der HRT-18 Zelllinie sollten durch eine Passage in Babymausgehirnen vermehrt werden.

Ein bis drei Tage alte BALB/c-Mäuse wurden mit je 0,02 ml der entsprechenden Virussuspension intracerebral infiziert.

Das Verhalten der Mäuse wurde zweimal am Tag kontrolliert.

Beim Auftreten von zentralnervösen Störungen (Ataxien) wurden die Mäuse nach Ätherbetäubung getötet und die Gehirne gewonnen. Die Gehirne von verendeten Mäusen wurden nicht in die Untersuchungen mit einbezogen.

Nach der Entnahme wurden die Gehirne bei -70°C eingefroren. In gefrorenem Zustand wurden sie in einen Zellhomogenisator aus Glas (Potter) überführt und das Gewebe unter Zugabe der zehnfachen Menge PBS aufgeschlossen. Die so hergestellten 10%-igen Gehirnsuspensionen wurden 30 Minuten bei 2200 g zentrifugiert, in Fläschchen zu je 1,0 ml abgefüllt und bei -70°C aufbewahrt. Die Virusvermehrung wurde durch direkte Hämagglutination nachgewiesen.

Die Gehirnsuspensionen dienten als Infektionsmaterial für die Adaptierung von HCV OC-43 an Zellkulturen.

1.3. Zellkulturadaptierung von HCV OC-43

Von den jeweiligen Zelllinien wurden Röhrcheneinschichtkulturen, sowie Einschichtkulturen in 25 cm² Plastikzellkulturflaschen hergestellt. Sofort nach dem Dichtwachsen des Zellrasens wurde das Anzuchtmedium abgesaugt und einmal mit EMEM ohne Zusätze gewaschen. Dann wurden die Röhrchen mit 2,0 ml, die Fläschchenkulturen mit 5,0 ml EMEM ohne Zusätze oder mit Zusatz von Trypsin in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml 10 Minuten bei 37°C behandelt. Anschließend wurden jeweils 8 Röhrcheneinschichtkulturen mit je 0,2 ml und jeweils 4 Fläschchen mit je 0,5 ml der Babymausgehirnsuspension beimpft. Nach einstündiger Adsorption bei 33°C bzw. 37°C wurde das Inokulum abgesaugt, die Zellkulturen zweimal mit EMEM ohne Zusätze gewaschen und jedes Röhrchen mit 1,5 ml, jedes Fläschchen mit 5,0 ml Erhaltungsmedium beschickt. Die Bebrütung von je 4 Röhrchen erfolgte bei 33°C und bei 37°C im Rollerapparat. Je 2 Fläschchen wurden stationär bei 33°C und 37°C bebrütet. Die beimpften Kulturen wurden regelmäßig auf cytopathische Veränderungen überprüft und nach 7 Tagen dreimal gefriergetaut ($-70^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$). Das Material von jeweils 2 gleichbehandelten Röhrchen wurde gepoolt. Anschließend wurde auf hämagglutinierende Eigenschaften überprüft und eine weitere Passage durchgeführt.

Als Kontrolle liefen nicht beimpfte, aber sonst gleich behandelte Kulturen bei jeder Passage mit.

1.4. Hämagglutinationstest (HA)

Zum Virusnachweis diente die Hämagglutinationsreaktion mit Rattenerythrozyten. Sie wurde im Mikrotiterverfahren durchgeführt (Greiner, 96 Loch U-Boden-Mikrotiterplatte). Die jeweilige Probe wurde in einer Menge von 0,05 ml in log 2-Schritten in NaCl-Phosphatpuffer (pH 7,4) mit Zusatz von 1% FBS verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,05 ml pro Vertiefung einer 0,5%-igen Rattenerythrozytensuspension, die ebenfalls 1% FBS enthielt. Die Platten wurden dann geschüttelt und bei Zimmertemperatur belassen.

Als Kontrollen liefen jeweils ein positives Antigen, eine negative Zellkultur- bzw. Gehirnpräparation, sowie eine Erythrozytensuspension mit.

Der Zeitpunkt des Ablesens war dann gegeben, wenn in der Erythrozytenkontrolle die Erythrozyten vollständig abgesunken waren. Dies war in der Regel nach ca. 2 Stunden der Fall.

Als HA-Titer wurde die höchste Verdünnung gewertet, bei der noch eine vollständige Hämagglutination auftrat.

Zur Charakterisierung des Hämagglutinins von HCV OC-43 wurden außerdem Erythrozyten von Maus, Meerschweinchen, Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein, Hund, Huhn und Mensch (Blutgruppe "0", Rhesusfaktor "positiv") benutzt. Die HA-Reaktion wurde hier bei 4°C, 25°C und 37°C durchgeführt.

1.5. Hämadsorptionstest (HAd)

Der Hämadsorptionstest wurde nicht kontinuierlich bei jeder neuen Viruspassage durchgeführt, sondern stichprobenartig im Abstand von mehreren Passagen.

Dabei wurde das Medium von 7 Tage bebrüteten, infizierten Zellkulturfläschchen abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit

PBS erfolgte die Überschichtung mit 1,0 ml einer 0,5%-igen Rattenerythrozytensuspension. Nach einer Adsorptionszeit von 60 Minuten bei Zimmertemperatur wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Beurteilung der Hämadsorption erfolgte unter dem Mikroskop.

Als Kontrolle diente eine gleich behandelte, aber nicht infizierte Zellkultur.

1.6. Bestimmung der Virusinfektiosität

Nach der Adaptierung von HCV OC-43 an Vero-Affennierenzellen wurde die Infektiosität der 11. Passage durch Titration im Mikrotitersystem (Falcon, Becton Dickinson & Co., Heidelberg) bestimmt.

Von der zu titrierenden Virussuspension wurden im Reagenzglas Verdünnungen in log 10-Schritten (10^1 - 10^{10}) mit EMEM ohne Zusätze hergestellt. In jede der Vertiefungen der Mikroplatte wurde 0,05 ml EMEM ohne Zusätze vorgelegt, mit Ausnahme der 8 Löcher der letzten Reihe, die jeweils 0,1 ml Medium enthielten und als Zellkontrolle dienten. Anschließend wurde von jeder der Virusverdünnungen in jeweils 8 Vertiefungen je 0,05 ml pipettiert. Zuletzt wurde jedes Loch mit $2,5 \times 10^5$ Verozellen in 0,1 ml EMEM mit 5% FBS beschickt. Die Platten wurden bei 37°C für 7 Tage in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Ablesung erfolgte aufgrund der Ausbildung eines cytopathischen Effektes. Die Titerberechnung wurde nach dem von Spaerman und Kaerber beschriebenen Verfahren (zit. nach Mayr et al., 1974) durchgeführt.

1.7. Erstellung einer Virusvermehrungskurve

Zur Charakterisierung der Vermehrungsrate von HCV OC-43 wurde von dessen 11. Verozellpassage eine Vermehrungskurve erstellt. Der Infektiositätstiter des Inokulums betrug $10^{6,426}$ KID₅₀/ml, der HA-Titer 1:256.

Zur Virusvermehrung wurden in 25 cm² Plastikzellkulturflaschen Verozell-Einschichtkulturen der 175. Passage herangezogen. Nach dem Dichtwachsen des Zellrasens (4 Tage) wurde das Medium abgesaugt und die Kulturen einmal mit 2,0 ml EMEM ohne Zusätze gewaschen. Die Fläschchen wurden daraufhin mit je 0,5 ml Virussuspension beimpft und das Inokulum 60 Minuten bei 37°C adsorbiert. Nach Absaugen des Inokulums und abermaligem Waschen mit 2,0 ml EMEM wurden die Fläschchen mit je 5,0 ml EMEM mit 1% FBS beschickt und bei 37°C bebrütet.

Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 168 und 192 Stunden p. inf. wurde bei jeweils zwei der infizierten Zellkulturfläschchen die Ausbildung des cpE beurteilt. Anschließend diente eines der Fläschchen der Titrierung des Gesamtvirus und eines der Titrierung des Virusgehaltes der Zell- bzw. der Mediumphase. Dabei wurde so vorgegangen, daß die extrazelluläre Virusfraktion durch Absaugen des Mediums der Fläschchen gewonnen wurde. Für die Bestimmung der zellgebundenen Virusfraktion wurde der verbleibende Zellrasen einmal mit 2,0 ml EMEM ohne Zusätze gewaschen und anschließend mit 5,0 ml frischem EMEM überschichtet.

Die Gesamtvirusprobe, zellgebundene und extrazelluläre Virusfraktion wurden bis zur Titration von HA-Aktivität und Infektiosität bei -70°C gelagert.

1.8. Reinigung von HCV OC-43

Das Virus wurde in der Verozelllinie vermehrt. Nach Auftreten von cytopathischen Veränderungen des Zellrasens (frühestens nach 5 Tagen) wurden die Kulturen einmal gefriergetaut (-70°C/25°C). Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Material 30 Minuten bei 6000g und 4°C zentrifugiert. Der HA-Titer betrug 1:256 bis 1:512. Der Überstand wurde in unmittelbarem Anschluß in einem Beckman SW 28 - Rotor 60 Minuten bei 28.000 Upm und 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde ca. 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt, ehe es in einer geringen

Menge TEN-Puffer (0,02 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA) resuspendiert wurde. 0,5 ml des suspendierten Sediments wurden nun auf 4,5 ml eines linearen 20-60% (wt/wt) Saccharosegradienten aufgetragen (Herstellung der Saccharoselösungen in TEN-Puffer) und 180 Minuten bei 30.000 Upm und 4°C in einem Beckman SW 56 - Rotor zentrifugiert. Die deutlich zu erkennende Virusbande wurde seitlich durch Punktion entnommen. Die Saccharosekonzentration der Bande wurde mit einem Refraktometer gemessen und betrug regelmäßig ca. 35%. Diese Fraktion wurde 1:10 mit TEN-Puffer verdünnt und 60 Minuten bei 40.000 Upm und 4°C in einem Beckman Rotor SW 60 Ti sedimentiert. Das Viruspellet wurde erneut in TEN-Puffer suspendiert und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

1.9. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Ca. 25 µl des im Saccharosegradienten gereinigten HCV OC-43 der 11. Verozellkulturpassage wurden auf die beschichtete Seite eines Trägernetzes aufgetragen. Nach einer Trocknungszeit von 60 Minuten wurde das Netz dreimal für jeweils 5 Minuten in Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Netz mit Fließpapier abgetrocknet und zur Kontrastierung für 2 Minuten in einen Tropfen Phosphor-Wolframsäure getaucht. Nach dem abermaligen Abtrocknen wurde das Präparat im Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10 C/CR) bei 40.000facher Vergrößerung untersucht.

1.10. Serologische Untersuchungen

1.10.1. Gewinnung von antikörperhaltigem Mäuseaszites

Zur genauen Kontrolle der Virusvermehrung ist ein spezifisches Immunserum von großer Bedeutung. Da anfangs HCV OC-43 noch nicht an Zellkulturen adaptiert war, blieb als einzige Möglichkeit zur Herstellung solcher Antikörper die Infektion empfänglicher Mäuse.

Um die Menge der Antikörper zu steigern, wurde mit Ehrlich'schen Asziteszellen in infizierten Mäusen ein Peritonealexsudat erzeugt (Ehrlich-Lettre Asziteszellen).

Die Ehrlich'schen Asziteszellen wurden uns freundlicherweise von Dr. Hornberger aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried zur Verfügung gestellt und zunächst in erwachsenen, HCV OC-43-antikörperfreien Mäusen vermehrt. Dann wurden 14 Tage alte antikörperfreie BALB/c Mäuse intracerebral mit 20 - 50 µl einer 10⁸-igen HCV OC-43 Gehirnsuspension infiziert. Nach 4 Wochen wurden in jede der Mäuse 10⁶ Ehrlich'sche Asziteszellen intraperitoneal injiziert. 8 Tage später wurden pro Maus 3-7 ml Aszites gewonnen.

Um die Spezifität dieses post-Infektionsaszites zu überprüfen, wurde nach der erfolgreichen Zellkulturadaptierung von HCV OC-43 das Verfahren wiederholt und ein post-vaccinaler-Aszites erzeugt. 14 Tage alte BALB/c Mäuse wurden hierbei mit jeweils 0,1 ml HCV OC-43 Verozellkulturmaterial der 10. Passage intraperitoneal immunisiert. Drei Reimmunisierungen wurden im Abstand von jeweils einem Monat durchgeführt. In diesem Fall wurden als Antigen je 0,2 ml einer gradientengereinigten HCV OC-43 Virussuspension der 11. Verozellpassage ohne Adjuvans intraperitoneal injiziert. Drei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden den Mäusen ebenfalls je 10⁶ Ehrlich'sche Asziteszellen intraperitoneal verabreicht. Nach 10 Tagen wurden pro Maus 5-8 ml Aszites gewonnen.

1.10.2. Herstellung eines Immunserums gegen HCV OC-43

Drei Meerschweinchen (à 200g), die keine Antikörper gegen HCV OC-43 und BCV V270/83 aufwiesen, wurde gradientengereinigtes HCV OC-43 (HA-Titer von 1:20.480) in einer Menge von je 0,2 ml gemischt mit 0,2 ml kompletten Freund'schen Adjuvans an 2 Stellen des Rückens subcutan injiziert.

4 Wochen später wurden 0,3 ml Virusmaterial gemischt mit

0,3 ml inkompletten Freund'schen Adjuvans ebenfalls subcutan verabreicht, weitere 4 Wochen später jeweils 0,2 ml. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Tieren in Narkose (20% Rompun^R und 80% Ketanest^R, 0,3 ml pro Tier) Blut entnommen. Nach der Serumgewinnung wurden die hämagglutinationshemmenden, sowie die neutralisierenden Antikörper bestimmt.

1.10.3. Serumproben verschiedener Spezies

Diese Untersuchungen sind eine Erweiterung der Arbeiten von Lu (1985) und Zink (1985). Soweit möglich, wurden die in diesen Arbeiten benützten Seren verwendet. Alle Proben waren 30 Minuten bei 56°C inaktiviert worden und wurden bei -20°C gelagert.

Vom Pferd wurden 131 Serumproben aus 86 Beständen untersucht. Sie wurden im Zeitraum von Januar 1982 bis Mai 1984 im Rahmen der Virusdiagnostik gesammelt.

Vom Rind wurden 145 Serumproben aus 103 Beständen untersucht. Sie stammten aus Einsendungen im Rahmen der Virusdiagnostik des Instituts aus den Jahren 1978 - 1984.

Vom Schaf wurden 200 Proben aus 31 Beständen untersucht. 70 Proben aus 18 Beständen stammten von Prof. Straub, BFA für Viruskkrankheiten der Tiere, Tübingen, 97 Proben aus 10 Beständen von Prof. Wachendörfer, Staatl. Veterinäruntersuchungsamt, Frankfurt/Main, 36 Proben aus 3 Beständen wurden uns von Dr. Büttner im Institut überlassen.

Die 92 untersuchten Ziegensereren stammten aus 16 Beständen. 70 Proben aus 15 Beständen wurden von Prof. Straub, Tübingen, zur Verfügung gestellt, 24 Proben von Prof. Wachendörfer, Frankfurt/Main.

Die 194 Schweineserumproben waren zwischen 1978 und 1983 an 4 verschiedenen Schlachttagen am Städtischen Schlachthof München gewonnen worden.

Außerdem wurden 88 Hundeseren aus dem Jahre 1983 untersucht. Sie stammten aus einer Hundeschule in Koblenz.

Von Kaninchen wurden 30 Serumproben untersucht. Sie stammten aus verschiedenen Instituten und wurden im Zeitraum zwischen 1973 und 1982 gesammelt.

Insgesamt standen 190 menschliche Seren zur Verfügung, 91 davon aus einem städtischen Einzugsgebiet (Prof. Deinhardt, Max-von-Pettenkofer-Institut, München) 99 aus einem ländlichen Einzugsgebiet (Dr. Haas, Kempten).

1.10.4. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

Das hergestellte Immuns Serum und die Ehrlich'schen Asziten wurden auf das Vorhandensein hämagglutinationshemmender Antikörper gegen HCV OC-43 untersucht. Der Test wurde nach Standardverfahren im Mikrotitersystem durchgeführt.

Vor der Untersuchung wurde das Serum bzw. die Asziten 30 Minuten bei 56°C inaktiviert. Anschließend wurden die Proben auf der Mikroplatte in log 2-Schritten mit NaCl-Phosphatpuffer, dem 1% FBS zugesetzt war, verdünnt. Nun wurde HCV OC-43, dessen Aktivität auf 4 hämagglutinierende Einheiten eingestellt worden war, in einer Menge von 0,05 ml pro Vertiefung zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Zimmertemperatur erfolgte die Zugabe von 0,05 ml/Loch einer 0,5%-igen Rattenerythrozytensuspension mit 1% FBS. Die Platten wurden geschüttelt und bei Zimmertemperatur belassen. Als Kontrollen liefen ein HCV OC-43- und BCV V270/83-antikörperfreies Serum (FBS) oder ein entsprechend negativer Ehrlich'scher Aszites mit, sowie die reine Erythrozytensuspension. Auch eine Hämagglutinationskontrolle des jeweiligen Untersuchungsgutes wurde durchgeführt. Der Ableszeitpunkt war dann gegeben, wenn die Erythrozyten der Kontrolle vollständig abgesunken waren (nach ca. 2 Stunden). Als HAH-Titer wurde die höchste Serum- bzw. Aszitesverdünnung angegeben, bei der noch eine vollständige Hemmung der Hämagglutination eingetreten war.

1.10.5. Neutralisationstest (NT)

Die Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern gegen HCV OC-43 in den Serumproben von Menschen und den verschiedenen Tierarten wurde im Mikroneutralisationstest durchgeführt. Das hergestellte Immunserum und die zur Verfügung stehenden Ehrlich'schen Asziten wurden ebenfalls auf diese Art untersucht.

Als Zellkulturen wurden Verozellen ab der 158. Passage eingesetzt. Als Testvirus wurde HCV OC-43 der 11. Passage auf Verozellen bei allen Untersuchungen verwendet. Die konstant eingesetzte Virusmenge betrug $100 \text{ KID}_{50}/0,05 \text{ ml}$. Alle untersuchten Proben wurden vor der Untersuchung 1:10 in EMEM ohne Zusätze vorverdünnt.

Die Proben wurden auf der Mikroplatte als Dreifachansatz in log 2-Schritten verdünnt. Anschließend wurden jeweils 0,05 ml Virusgebrauchsverdünnung zugegeben. Nach einer Bindungszeit von 60 Minuten bei 37°C wurden in jede Vertiefung der Mikroplatten 0,1 ml einer Verozellsuspension ($\approx 2,5 \times 10^5$ Zellen) mit 5% FBS pipettiert.

Bei jedem Versuchsansatz wurden eine Virusrücktitration, Serumkontrolle, Zellkontrolle, sowie positive und negative Seren bzw. Ehrlich'sche Asziten mitgeführt. Nach einer Bebrütungszeit von 7 Tagen bei 37°C in 5% CO₂-Luftgemisch wurden die Tests durch Beurteilung des cpE abgelesen. Als Titer wurde die höchste Serumverdünnung angegeben, bei der mindestens 2 Vertiefungen keinen cpE zeigten.

Neutralisationstests zur Bestimmung von Antikörpern gegen BCV wurden in dieser Arbeit nach der gleichen Technik, allerdings mit 5×10^5 fetalen, bovinen Lungenzellen/0,1 ml durchgeführt. Als Antigen diente BCV V270/83 der 14. Passage in fetalen, bovinen Lungenzellen.

1.11. Herstellung monoklonaler Antikörper

Es wurde versucht monoklonale Antikörper gegen HCV OC-43 und BCV V270/83 herzustellen.

1.11.1. Immunisierung der Mäuse

HCV OC-43- bzw. BCV V270-antikörperfreie, 8-12 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mindestens zweimal im Abstand von 21 Tagen mit 0,2 ml des entsprechenden, über einen Saccharosegradienten (20-60% wt/wt) gereinigten Virusstammes immunisiert. Erst- und Reimmunisierung wurden unter Zusatz der gleichen Menge Freund'schen Adjuvans intraperitoneal durchgeführt. 4 Tage vor der Fusion wurde ein drittes Mal mit 0,2 ml gradientengereinigtem Virusmaterial ohne Adjuvans immunisiert.

1.11.2. Zellfusion

Die in dieser Arbeit verwendete Technik der Zellfusion wurde nach Tappert (1981) durchgeführt und in einigen Punkten abgewandelt.

Aufbereitung der Milz: Einer immunisierten, getöteten Maus wurde unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen, in GKN-Puffer (8,0 g NaCl; 0,4 g KCl; 1,77 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,69 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 2,0 g Glucose; 0,01 g Phenolrot ad 1000 ml Aqua dest.) gewaschen und in 4 bis 6 kleine Stückchen geschnitten. Diese Milzstückchen wurden mit dem Stempel einer 10 ml-Spritze unter ständiger Zugabe von 10 ml GKN-Puffer durch ein Netz (Porenweite 60 micron) zerrieben. Die gewonnene Milzzellsuspension wurde in ein konisches 40 ml-Zentrifugenglas überführt und 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml GKN-Puffer aufgenommen. Vor der erneuten Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten wurden 0,1 ml der Suspension zur Zellzählung entnommen. Diese wurde nach Vitalfärbung mit Trypanblau in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer durchgeführt.

Vorbereitung der Myelomzellen: Die Myelomzellen (X63-Ag8.653) von zwei dichtgewachsenen 175 cm^2 -Zellkulturflaschen wurden suspendiert, auf 3 konische 40 ml-Zentrifugengläschen verteilt und über 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Die Sedimente der

3 Gläschen wurden zusammen in 10 ml GKN-Puffer suspendiert und nach Entnahme von 0,1 ml zur Zellzählung erneut bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert.

Zellfusion: Die Milz- und Myelomzellsuspensionen wurden im Verhältnis 3:1 gut gemischt und 8 Minuten bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette sehr sorgfältig abgesaugt. Das Zellsediment wurde nun mit 1,0 ml 40%-igem Polyäthylenglycol 1540 (J.T. Baker Chemical & Co., Phillipsburg, N.Y., USA) vorsichtig suspendiert. Nach der Einwirkungszeit von 1 Minute bei 37°C wurde die PEG-Konzentration durch Zugabe von 1,0 ml serumfreiem GKN verdünnt. Nach einer weiteren Minute wurden 2,0 ml serumfreier GKN-Puffer zugegeben. 2 Minuten später wurde die Reaktion mit 10 ml GKN mit 20% dialysiertem FBS gestoppt. Diese Zellsuspension wurde in HAT-Medium (Selektivmedium) aufgenommen, das als feeder cells dienende Peritonealmakrophagen enthielt. Das Gesamtvolumen von 180 ml wurde auf 9 Mikroplatten verteilt (0,2 ml/Loch) und bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Luft-Atmosphäre bebrütet. Einmal pro Woche wurden je Vertiefung 0,1 ml des Mediums gewechselt. Nach 14 Tagen, als nicht fusionierte Milz- und Myelomzellen bereits abgestorben waren, wurde auf HT-Medium umgestellt.

1.11.3. Nachweis von Coronavirus-Antikörpern

Ab dem 6. Tag nach der Zellfusion waren unter dem Mikroskop kleine Kolonien von sich vermehrenden Hybridomazellen zu erkennen, die binnen 14 Tagen makroskopisch sichtbar waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde damit begonnen, das Medium der Löcher, in denen Kolonien gewachsen waren, im Neutralisationstest und in der Hämagglutinationshemmungsreaktion auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern zu testen. Diese beiden Screening-Teste wurden als Plus-Minus-Reaktion der 1:5 verdünnten Zellkultur-Überstände durchgeführt.

1.11.4. Isolierung von Coronavirus-Antikörper-produzierenden Hybridomas

Kolonien, in deren Überstand Antikörper nachgewiesen worden waren, wurden mit einer Pasteurpipette aufgesaugt und auf 24-Loch-Platten (Flow Laboratories, Bonn) übertragen, in Plastikzellkulturflaschen vermehrt und dann nach Standardverfahren mit 7,5% DMSO tiefgefroren. Bei jedem der Vermehrungsschritte wurde die Antikörperproduktion überprüft.

1.11.5. Klonierung

Antikörperproduzierende Hybridomas wurden mit der Limiting dilution-Technik kloniert. Nach dem Suspendieren und Zählen der Hybridomas wurde mit EMEM + 20% FBS eine Suspension von 10^5 Zellen/ml hergestellt. Hiervon wurde die nachfolgende Verdünnungsreihe angelegt:

- a) 4,5 ml EMEM + 20% FBS + 0,5 ml Hybridomasusp. = 10^4 Z/ml
- b) 9,0 ml EMEM + 20% FBS + 1,0 ml Verdünnung a = 10^3 Z/ml
- c) 18,0 ml EMEM + 20% FBS + 2,0 ml Verdünnung b = 10^2 Z/ml
- d) 9,0 ml EMEM + 20% FBS + 1,0 ml Verdünnung c = 10^1 Z/ml
- e) 5,0 ml EMEM + 20% FBS + 5,0 ml Verdünnung c = 50 Z/ml

Die Reihen c, d und e wurden mit Peritonealmakrophagen enthaltendem EMEM + 20% FBS 1:3 verdünnt, in je 2 Mikroplatten eingesät und bei 37°C und 5%-iger CO₂-Luftatmosphäre bebrütet. Zellkulturüberstand von Löchern, in denen nur 1 Kolonie gewachsen war, wurde auf das Vorhandensein von Antikörpern untersucht. Positive Kulturen wurden dann erneut in 24-Loch-Platten mit Makrophagen als feeder cells, anschließend in Zellkulturflaschen vermehrt und tiefgefroren, bzw. zur Produktion von Aszites verwendet.

1.11.6. Produktion von Aszites

Die Konzentration der monoklonalen Antikörper ist an die Menge der produzierenden Zellen gebunden. Die Zellzahl ist jedoch durch den Stoffwechsel der Zellkultur begrenzt. Um dies zu umgehen, wurden Hybridomazellen in der Peritonealkavität von BALB/c-Mäusen

vermehrt. Die Mäuse waren 14 Tage zuvor 1 ml Pristane (2, 6, 10, 14 Tetramethyl-Pentadecan, Aldrich, Steinheim) intraperitoneal immunsuppressiv behandelt worden. Etwa 3×10^6 Zellen eines Klones wurden 10 Minuten bei 500g zentrifugiert und in 3,0 ml Medium aufgenommen. Einer Gruppe von 3 Mäusen wurden je 1,0 ml i.p. injiziert. Die Aszitesernte wurde nach Brodeur et al. (1984) durchgeführt. Dazu wurde die Bauchhöhle nach ca. 1 Woche mit einer Kanüle Nr. 21 punktiert. Bis zum Versiegen der Aszitesproduktion wurden weitere Punktionen im Abstand von 2 Tagen durchgeführt. Der Aszites wurde bei 2200g 20 Minuten zentrifugiert, bei 4°C 12 - 24 Stunden aufbewahrt und nochmals zentrifugiert. Die Proben wurden dann portioniert bei -20°C aufbewahrt.

1.11.7 Wiederanzüchtung der im Aszites enthaltenen Hybridomas in Zellkultur

Der unter sterilen Bedingungen gewonnene Aszites wurde 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt, das Zellsediment wurde zur Lysis der vorhandenen Erythrozyten in ca. 2,0 ml einer 0,83%-igen NH_4Cl -Lösung (in Aqua dest.) suspendiert, nach einer Minute in 20 ml Medium aufgenommen und 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Anschließend wurde das gewaschene Zellsediment 1:5, bezogen auf die gewonnene Aszitesmenge, verdünnt. Je 3,0 ml der Hybridomasuspension wurden in 175 cm^2 -Zellkulturflaschen mit 30 ml EMEM + 20% FBS eingesäht. 24 Stunden später wurde das Medium gewechselt und die Menge auf 50 ml pro Flasche erhöht.

Nachdem die Zellkulturflaschen dichtgewachsen waren, wurden bei einem Teil die Hybridomas über 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten und so serumfreier, monoklonale Antikörper enthaltender Zellkulturüberstand produziert.

2. Ergebnisse

2.1. Virusisolierung

HCV OC-43 konnte in HRT-18 Zellen aus dem von Dr. Tyrrell stammenden Mäusegehirnmaterial zunächst isoliert werden. Der HA-Titer der 4 Tage p.i. gewonnenen Zellkultursuspensionen betrug 1:4. Da auch die Kontrollröhrchen Zytolyse aufwiesen, konnte die Ausbildung eines cpE nicht auf eine Virusvermehrung zurückgeführt werden. Der HA-Titer stieg in der 1. Passage auf 1:8 bis 1:16. Zytolyse war wiederum auch in den Kontrollen zu beobachten. In der 2. und 3. Passage war die HA-Reaktion negativ, beimpfte und nicht beimpfte Kulturen zeigten 100% Zytolyse.

2.2. HCV OC-43-Vermehrung in Babymäusen

HCV OC-43 vermehrte sich sehr gut in Babymausgehirnen. Die Höhe des HA-Titers der so gewonnenen Gehirnsuspensionen war abhängig vom Virusgehalt des Infektionsmaterials und von der Inkubationszeit.

Nach Verimpfung des Originalmaterials betrug der HA-Titer 4 Tage p.i. 1:1280. Das in HRT-18 Zellen isolierte Virus wies 5-6 Tage nach i.c. Injektion einen Titer von 1:80 auf. Mit HCV OC-43 der 1. Passage wurden in 4-6 Tagen p.i. HA-Titer von 1:320 bis 1:640 erzielt.

Die Ergebnisse der Virusisolierung und der Vermehrung in Babymäusen sind zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt.

2.3. Adaptierung der Virusisolate an Zellkulturen

Nach der Babymauspassage wurden von jeder Zelllinie trypsinbehandelte und -unbehandelte, stationäre und Rollerkulturen mit der virushaltigen Gehirnsuspension beimpft und bei 33°C, sowie bei 37°C bebrütet. Es wurden jeweils 6 Passagen durchgeführt, wobei die Virusvermehrung anhand der HA-Reaktion und der Ausbildung eines cpE überprüft wurde.

Tabelle 2: Vermehrung von HCV OC-43 durch Passage in BALB/c-Babymausgehirnen (angegeben sind die reziproken Werte der HA-Reaktion mit Ratten-erythrozyten).

Virussuspension bzw. Zellkult.-Mat.	HA-Titer des Infektions-Mat.	Inkubat.-Zeit in Tagen	HA-Titer der 10%-igen Geh.-Susp.
1. HCV OC-43 Ausgangsmat. aus England	20	4	>1280
2. Isolierung auf HRT-18- Zellen	4	5-6	80
3. 1. Passage auf HRT-18- Zellen	8-16	4-6	320 - 640

Nur in stationären Verozellkulturen ließen sich in der 1. Passage Anzeichen einer Virusvermehrung feststellen. Ab dem 4. Tag p.i. waren im Zellrasen abgekugelte, umfangsvermehrte Zellen zu erkennen, deren Anteil sich bis zum 7. Tag p.i. auf ca. 40% erhöhte. Diese Veränderungen waren bei den bei 33°C und 37°C bebrüteten Kulturen gleich. Eine besondere zusätzliche Wirkung durch Trypsin war nicht zu beobachten. Bei den bei 33°C bebrüteten Fläschchen folgte der Abkuglung der Zellen jedoch noch bis zu 20% Zytolyse. Auch hier war das Bild bei trypsinbehandelten und -unbehandelten Kulturen gleich.

Nach dem dreimaligen Gefriertauen am 7. Tag p.i. wies das bei 33°C bebrütete Zellkulturmaterial einen HA-Titer von 1:10 auf. Bei den bei 37°C bebrüteten Fläschchen war keine HA-Aktivität nachzuweisen.

Der Zellrasen der bei 33°C bebrüteten Kontrollfläschchen wies am 7. Tag ebenfalls vereinzelt Löcher auf, es fehlten aber die bei den infizierten Kulturen zu beobachtende Abkuglung und Formveränderung der Zellen.

In den nachfolgenden Zellkulturpassagen konnten weder die geschilderten cytopathischen Veränderungen, noch Hämagglutination festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Adaptierungsversuche mit Vero-Rollerkulturen, sowie HRT-18-, HEL-, BSC-1- und MA-104-Zellen müssen als negativ angesehen werden.

Bei HRT-18- und HEL-Zellen wies der Zellrasen nach 7 Tagen Bebrütung in infizierten und nicht infizierten Kulturen ca. 90% Zytolyse auf, bei Vero-Zellkulturröhrchen ca. 50%. Der Zellrasen von BSC-1- und MA-104-Zellen zeigte auch in den infizierten Kulturen nach 7 Tagen keinerlei Veränderungen.

Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen und dem Hinweis auf die Möglichkeit der HCV OC-43-Vermehrung in Verozellen, wurden die Versuchsbedingungen in einigen Punkten abgewandelt.

Es wurden Verozellen verwendet, die mindestens 7 Tage alt waren. Das Infektionsmaterial wurde 90 Minuten bei 37°C adsorbiert und die Zellkulturen anschließend nur einmal mit EMEM ohne Zusätze

gewaschen. Das Erhaltungsmedium bestand aus 50% EMEM und 50% TC-199. Die Zellen wurden 7 Tage stationär bei 33°C bebrütet. Das Erhaltungsmedium enthielt ab der 5. Passage 1% FBS. Ab der 6. Passage wurde ein Teil der Kulturen mit gutem Erfolg bei 37°C bebrütet. Nach einer weiteren Passage wurde die Wirksamkeit der Trypsinbehandlung der Zellkulturen überprüft. Ab der 8. Passage wurden die Kulturen ohne Adsorptionszeit infiziert. Ab der 9. Passage bestand das Erhaltungsmedium aus EMEM mit 1% FBS.

Mit diesem Verfahren, das in Tabelle 3 übersichtsmäßig dargestellt ist, konnte HCV OC-43 gut an Verozellen adaptiert werden.

Der cytopathische Effekt entwickelte sich ab dem 4.Tag p.i. mit den bereits geschilderten Charakteristika, wie Zellabkuglung und Zytolyse, die sich im Verlauf der weiteren Passagen noch deutlicher ausprägten. Degenerationerscheinungen des Zellrasens der Kontrollen, die sich durch vereinzelt auftretende Löcher äußerten, konnten durch Zusatz von 1% FBS zum Erhaltungsmedium erfolgreich verhindert werden, sodaß der cpE ausschließlich auf die Virusvermehrung zurückgeführt werden konnte.

Ein bei der 3. Passage mit Rattenerythrozyten durchgeführter HämadSORptionstest lieferte ein zweifelhaftes Ergebnis. Die Erythrozyten lagerten sich nur spärlich an die infizierten Verozellen an. Dagegen war der HämadSORptionstest bei der 10. Passage eindeutig positiv. Bei den infizierten Kulturen waren die Erythrozyten in großer Zahl an die Zelloberfläche angelagert, während sie bei den nicht infizierten Kontrollen nur eine spärliche Adhäsion zeigten.

Die Adaptierung von HCV OC-43 an Verozellen konnte durch eine Wiederholung des Versuchs mit Mäusegehirnmaterial ein zweites Mal nachvollzogen werden. Nach 5 Passagen bei 33°C betrug der HA-Titer des gefriergetauten Zellkulturmaterials 1:32.

Für alle weiteren Versuche wurde HCV OC-43 der 11. Verozellpassage verwendet. Der durch Mikrotitration ermittelte Infektiositätstiter betrug $10^{5,125} \text{ KID}_{50}/0,05 \text{ ml}$.

Tabelle 3: Adaptierung von HCV OC-43 an Verozellkulturen in 25 cm²-Zellkulturflaschen

Passage	Infekt.-Mat.	Abs.-Zeit Abs.-Temp.	Virusmedium	FBS im V.-Med. (%)	Trypsin- behandl. d. Kult.	Bebrüt.-Temp.	HA-Titer
1	Geh.-Susp. (10%); 0,5 ml	90 min 37°C	EMEM + TC-199 (50/50)	0	2,5µg/ml	33°C	<2
2	1. Passage 0,5 ml	90 min 37°C	EMEM + TC-199 (50/50)	0	2,5µg/ml	33°C	4
3	2. Passage 0,5 ml	90 min 37°C	EMEM + TC-199 (50/50)	0	2,5µg/ml	33°C	4
4	3. Passage 0,5 ml	90 min 37°C	EMEM + TC-199 (50/50)	0	2,5µg/ml	33°C	8
5	4. Passage 0,5 ml	90 min 37°C	EMEM + TC-199 (50/50)	1	2,5µg/ml	33°C	32
6	5. Passage 0,5 ml	90 min 37°C	EMEM + TC-199 (50/50)	1	2,5µg/ml	33°C 37°C	128 32
7	6. Passage 0,5 ml	90 min 37°C	EMEM + TC-199 (50/50)	1	0	33°C 37°C	256 128

Tabelle 3: Fortsetzung

Passage	Infekt.-Mat.	Abs.-Zeit Abs.-Temp.	Virusmedium	FBS im V.-Med. (%)	Trypsin- behandl. d. Kult.	Bebrüt.-Temp.	HA-Titer
8	7. Passage 0,5 ml	- -	EMEM + TC-199 (50/50)	1	0	37°C	128
9	8. Passage 0,5 ml	- -	EMEM	1	0	37°C	512
10	9. Passage 0,5 ml	- -	EMEM	1	0	37°C	512
11	10. Passage 0,5 ml	- -	EMEM	1	0	37°C	512

Als HA-Titer wurde der reziproke Maximalwert einer jeden Passage angegeben.

2.4. Vermehrungskurve von HCV OC-43

In Abbildung 2 wurden die Infektiositätstiter bei 37°C, in der Abbildung 3 die HA-Titer der Zell- und Mediumphase, sowie der Gesamtvirusphase von HCV OC-43 über einen Zeitraum von 192 Stunden p. inf. angegeben. In der Abbildung 4 ist die Entwicklung des cpE aufgeführt. Der prozentuale Anteil der abgekugelten Zellen und der Zytolyse des Zellrasens wurde beurteilt.

Als Infektionsmaterial diente HCV OC-43 der 11. Verozellpassage, mit einem Infektiositätstiter von $10^{6,43}$ KID₅₀/ml und einem HA-Titer von 1:256.

In den ersten 8 Stunden p. inf. war nur in der Gesamtvirusphase mit $10^{2,93}$ KID₅₀/ml Infektiosität nachzuweisen. Anschließend stiegen die Titer in allen drei Phasen sehr rasch an und 48 Stunden p. inf. wurden in der Zellphase mit $10^{6,3}$ KID₅₀/ml, 60 Stunden p. inf. in der Mediumphase mit $10^{6,55}$ KID₅₀/ml und etwas verzögert 96 Stunden p. inf. auch in der Gesamtvirusphase mit ebenfalls $10^{6,55}$ KID₅₀/ml die Maxima erreicht. Dem Absinken der Infektiositätstiter in allen drei Virusphasen folgte ein erneuter, aber langsamer Anstieg. Mit Ausnahme der Mediumphase ($10^{6,93}$ KID₅₀/ml), wurden die Maximalwerte nicht mehr erreicht. 168 Stunden p. inf. fiel die Infektiosität dann steil ab.

HA-Aktivität war in der Gesamtvirus- und Zellphase erstmals 16 Stunden p. inf. nachzuweisen, sie stieg dann in beiden Phasen kontinuierlich an, wobei die Zellphase immer eine Titerstufe unter der Gesamtvirusphase lag und erreichte 48 Stunden p. inf. ein Plateau von 1:64 bzw. 1:32. Die Aktivität der Gesamtvirusphase blieb, von einer Schwankung um eine Titerstufe abgesehen, relativ stabil. 72 Stunden p. inf. sank der HA-Titer der Zellphase kontinuierlich ab, während der 24 Stunden p. inf. erstmals auftretende und bis dahin gleichbleibend niedrige Titer der Mediumphase jetzt rasch anstieg und 120 Stunden p. inf. mit 1:16 sein stabiles Maximum erreichte.

Der cpE entwickelte sich erst relativ spät. 60 - 72 Stunden p. inf. waren vereinzelt abgekugelte Zellen zu erkennen. Die maximale Ausbildung zeigte sich 168 Stunden p. inf. mit 70% Zytolyse und 80% abgekugelten Zellen.

Abbildung 2: Vermehrungskurve von HCV OC-43. Dargestellt sind die Infektiositätstiter von Zell-, Medium- und Gesamtvirusphase bis 192 Stunden nach der Infektion.



Abbildung 3: Vermehrungskurve von HCV OC-43. Dargestellt sind die Hämagglutinationstiter von Zell-, Medium- und Gesamt-virusphase bis 192 Stunden nach der Infektion.

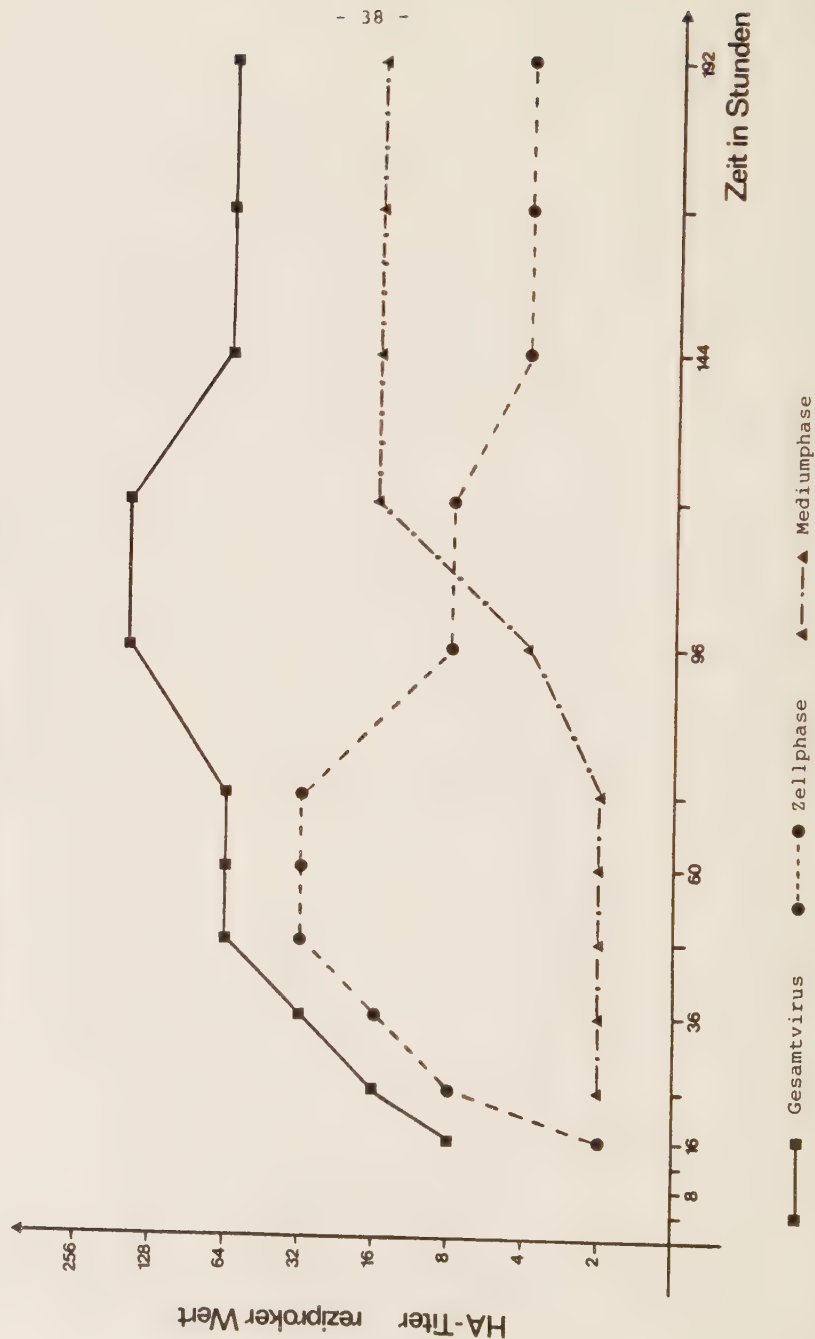
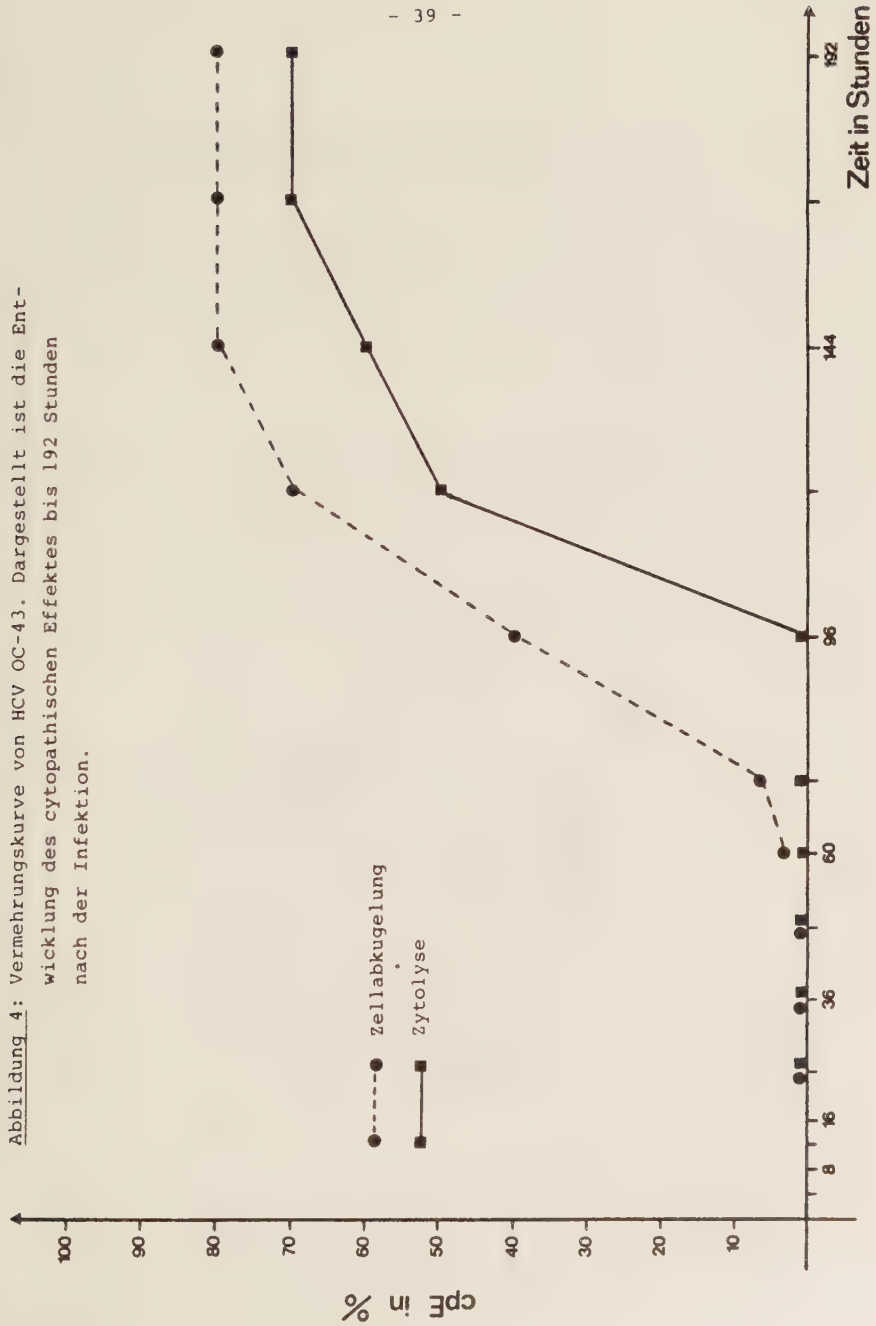


Abbildung 4: Vermehrungskurve von HCV OC-43. Dargestellt ist die Entwicklung des cytopathischen Effektes bis 192 Stunden nach der Infektion.



2.5. Untersuchungen über die Spezifität des Hämagglutinins von HCV OC-43 mit Erythrozyten verschiedener Spezies

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Untersuchungen zum Hämagglutininnachweis des zellkulturadaptierten HCV OC-43.

HCV OC-43 agglutiniert Erythrozyten der Ratte und der Maus, sowie geringgradig auch von Huhn und Mensch (Blutgruppe "0"). Die Erythrozyten der anderen untersuchten Tierarten wurden nicht agglutiniert.

Die höchsten Titerwerte wurden nach Inkubation bei 4°C erreicht. Ratten- und Mäuseerythrozyten reagierten dabei gleich empfindlich. Die Inkubation bei 25°C bzw. 37°C reduziert die erreichbaren Titer bei Mäuseerythrozyten auf die Hälfte, bei Rattener erythrozyten auf ein Viertel. Die ohnedies niedrigen Titer mit Menschen- und Hühnererythrozyten wurden weiter erniedrigt. Bei 37°C wurden Menschenerythrozyten überhaupt nicht mehr agglutiniert.

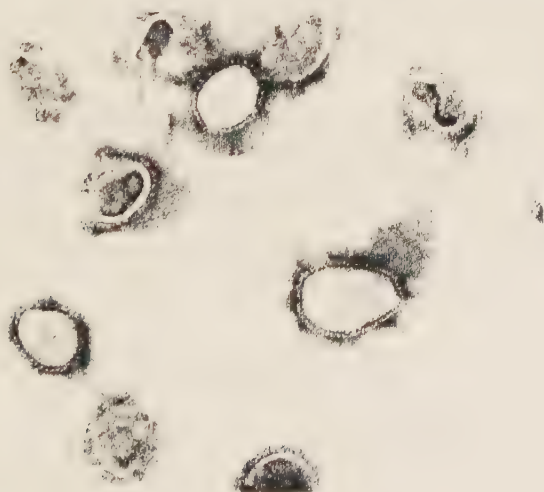
Tabelle 4: Hämagglutinationstiter des an Verozellen adaptierten HCV OC-43 (11. Passage) mit Erythrozyten verschiedener Spezies bei 4°C, 25°C und 37°C.
Angegeben sind die reziproken Endwerte.

Spezies	4°C	25°C	37°C
Ratte	512	128	128
Maus	512	256	256
Meerschweinchen	<2	<2	<2
Huhn	16	8	8
Rind, Schaf, Ziege	<2	<2	<2
Pferd, Schwein, Hund	<2	<2	<2
Mensch ("0")	4	2	<2

2.6. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Bei der Untersuchung des gradientengereinigten HCV OC-43-Zellkulturmaterials waren die pleomorphen, im Durchmesser 80-160 nm betragenden Coronaviruspartikel sehr deutlich zu erkennen. Auch die keulenförmigen Projektionen der Hülle stellten sich in der Negativ-Kontrast-Färbung sehr gut dar. Die Abbildung 5 zeigt einen Ausschnitt in 160.000-facher Vergrößerung.

Abbildung 5 : Elektronenmikroskopische Darstellung von HCV OC-43 mit Negativ-Kontrast-Färbung



100 nm

2.7. Epizootiologische Untersuchungen über das Vorkommen von HCV OC-43- Antikörpern in Serumproben verschiedener Spezies

Mit Hilfe des Neutralisationstestes wurden 190 menschliche Seren, 131 Seren von Pferden, 145 Seren von Rindern, 200 Seren von Schafen, 92 Seren von Ziegen, 194 Seren von Schweinen, 88 Seren von Hunden und 30 Seren von Kaninchen auf HCV OC-43-Antikörper untersucht.

Die 131 Pferdeseren stammten aus 86 Pferdehaltungen. 83 Seren (63%) wiesen Titer von 1:20 bis $\geq$ 1:640 auf. 12 Seren (9%) hatten einen Titer von $\geq$ 1:640. Bei 48 Seren (37%) war der Titer $\leq$ 1:10.

Bei den 145 Rinderseren aus 103 Beständen hatten 144 (99,3%) Titer von 1:20 bis $\geq$ 1:640. Hiervon reagierten 79 (54,5%) mit Titern von 1:640 und höher. Nur ein Serum (0,7%) hatte einen Titer von $<$ 1:10.

Die 200 Schafseren stammten aus 31 Beständen. Bei 48 (24%) lagen die Titer im Bereich von 1:20 bis $\geq$ 1:640, von denen wiederum 4 (2%) einen Titer von $\geq$ 1:640 aufwiesen. Bei 152 Seren (76%) war der Titer $\leq$ 1:10.

Bei den 92 Ziegenser aus 16 Beständen war nur bei 1 (1,09%) ein Titer von 1:20 festzustellen. 91 Seren reagierten negativ mit Titern von $<$ 1:10.

118 (61%) der 194 untersuchten Schweineseren wiesen Titer von 1:20 bis $\geq$ 1:640 auf. 12 (6%) hatten Titer von $\geq$ 1:640. 76 (39%) hatten Titer von $\leq$ 1:10.

47 (53,4%) der 88 Hundeseren lagen im Titerbereich von 1:20 bis $\geq$ 1:640. 20 (22,7%) hatten Titer von $\geq$ 1:640. 41 Seren (46,6%) reagierten mit Titern von $\leq$ 1:10.

Von den 30 Kaninchenser wiesen 21 (70%) Titer von 1:20 bis $\geq$ 1:640 auf. 2 Seren (6,7%) zeigten Titer von $\geq$ 1:640. 9 Seren (30%) hatten Titer von $\leq$ 1:10.

Bei den 190 menschlichen Seren hatten 177 (93%) Titer von 1:20 bis $\geq 1:640$. 2 (1%) davon reagierten mit einem Titer von $\geq 1:640$. 13 Seren hatten Titer von $\leq 1:10$.

Tabelle 5 gibt eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse. In der Abbildung 6 ist die prozentuale Verteilung der Seren mit einem Titer von $\leq 1:10$ und Seren mit Titern von 1:20 bis $\geq 1:640$ dargestellt.

Um die epizootiologische Bedeutung von HCV OC-43 und BCV-Infektionen und eventuelle Zusammenhänge beurteilen zu können, wurde die Tabelle 6 zusammengestellt. Sie enthält die, von Lu (1985) für die entsprechenden Seren ermittelten Antikörpertiter gegen BCV V270/83.

In Abbildung 7 wurde die prozentuale Verteilung der Antikörpertiter gegen HCV OC-43 und BCV in den untersuchten Seren der verschiedenen Spezies graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse der Humansenen wurden in Tabelle 7 nach deren Herkunft aufgeschlüsselt.

Von 91 Seren aus dem Einzugsbereich der Stadt München (Max-von-Pettenkofer-Institut) wiesen 78 (86%) einen Titer von 1:20 bis 1:320 auf. Keines der Seren hatte Titer von $\geq 1:640$. Bei 13 Seren lagen die Titer bei $\leq 1:10$.

Von den 99 Seren aus dem eher ländlichen Einzugsbereich der Stadt Kempten hatten alle 99 (100%) Titer von 1:20 bis $\geq 1:640$. 2 Seren (ca.2%) reagierten mit Titern $\geq 1:640$.

Die Tabelle 7 enthält neben den Antikörpertitern gegen HCV OC-43 auch die von Lu ermittelten BCV-Antikörpertiter.

In Abbildung 8 wurde die prozentuale Verteilung der Antikörpertiter gegen HCV OC-43 und BCV in Humansenen verschiedener Einzugsbereiche graphisch dargestellt.

Tabelle 5: Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen HCV OC-43 in Seren verschiedener Spezies

Serumproben	Mensch	Pferd	Rind	Schaf	Ziege	Schwein	Hund	Kaninchen
Anzahl der Serumproben	190	131	145	200	92	194	88	30
Anzahl der Bestände/ Population	-	86	103	31	16	-	-	-
< 1:10	2	29	1	139	91	43	39	8
1:10	11	19	0	13	0	33	2	1
1:20	24	11	1	3	1	16	1	1
1:40	48	15	4	15	0	26	8	3
1:80	52	23	12	11	0	22	3	4
1:160	31	12	14	9	0	30	7	5
1:320	20	10	34	6	0	12	8	6
≥ 1:640	2	12	79	4	0	12	20	2

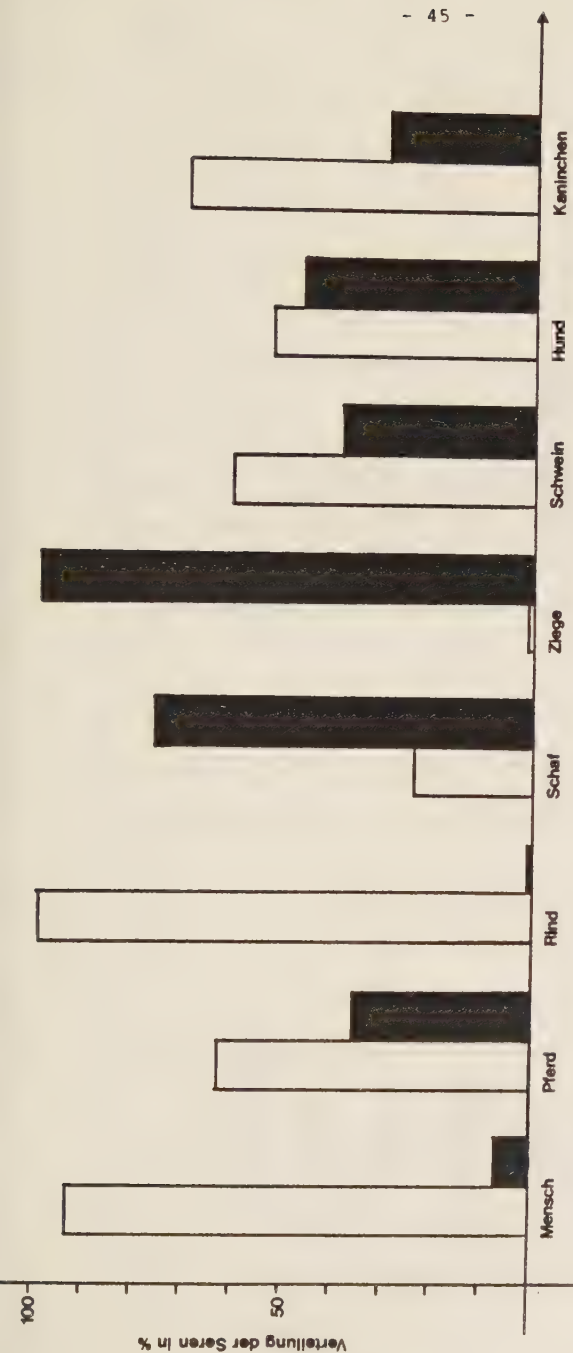


Abbildung 6: Prozentuale Verteilung der neutralisierenden Antikörpertiter gegen HCV OC-43 in Seren verschiedener Spezies

$\leq 1:10$

 $\geq 1:20$ bis $\geq 1:640$

Tabelle 6: Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen BCV in Seren verschiedener Spezies nach Lu, (1985).

Serumproben	Mensch	Pferd	Rind	Schaf	Ziege	Schwein	Hund	Kaninchen
Anzahl der Serumproben	190	131	145	200	92	194	88	30
Anzahl der Bestände/ Population	-	86	103	31	16	-	-	-
< 1:10	0	34	0	82	80	67	38	8
1:10	4	14	0	52	9	23	7	0
1:20	6	24	3	21	3	20	2	1
1:40	24	22	8	19	0	21	4	3
1:80	72	10	22	16	0	22	2	3
1:160	46	16	16	6	0	22	7	8
1:320	33	3	42	4	0	12	3	5
> 1:640	5	8	54	0	0	7	25	2

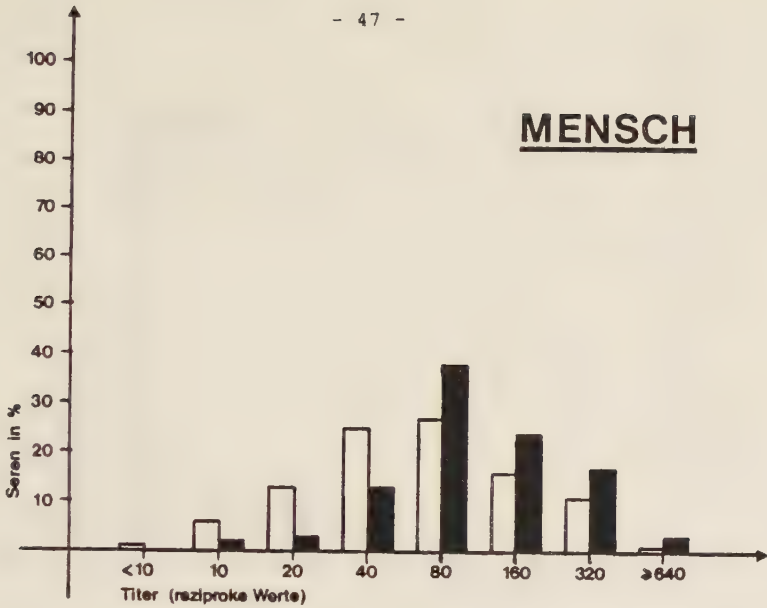


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der Neutralisationstiter gegen HCV OC-43 und BCV, bezogen auf die Gesamtzahl der jeweils getesteten Seren.



= HCV OC-43



= BCV

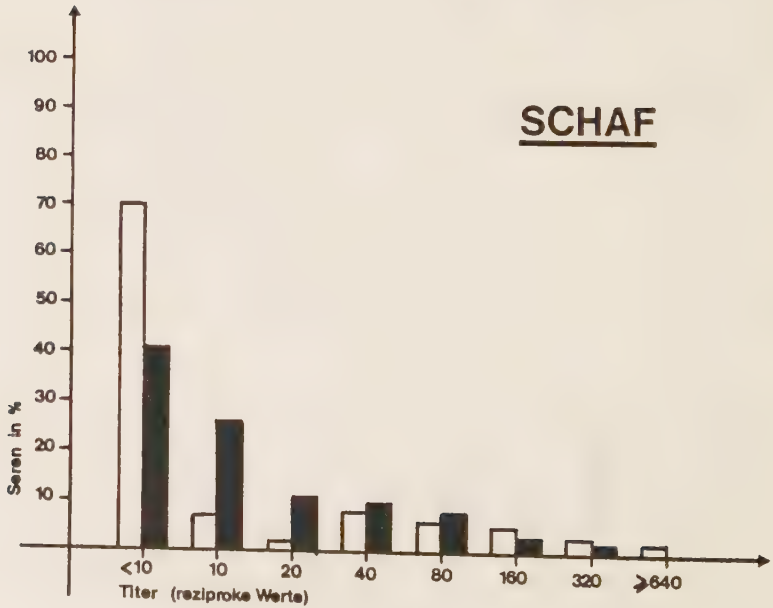
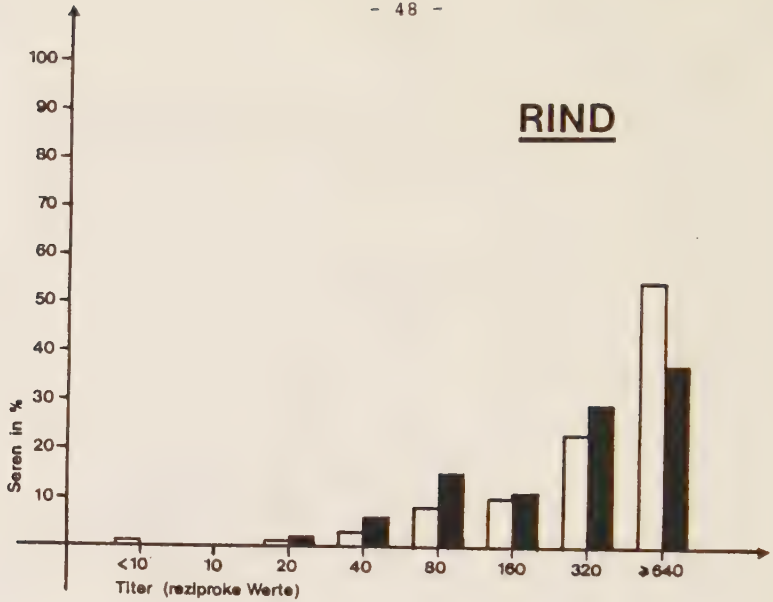


Abbildung 7: Fortsetzung

□ = HCV OC-43

■ = BCoV

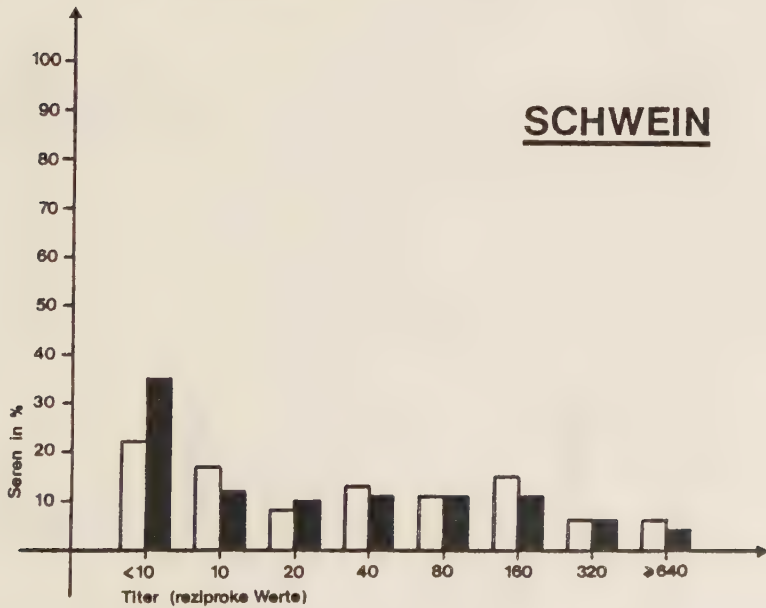
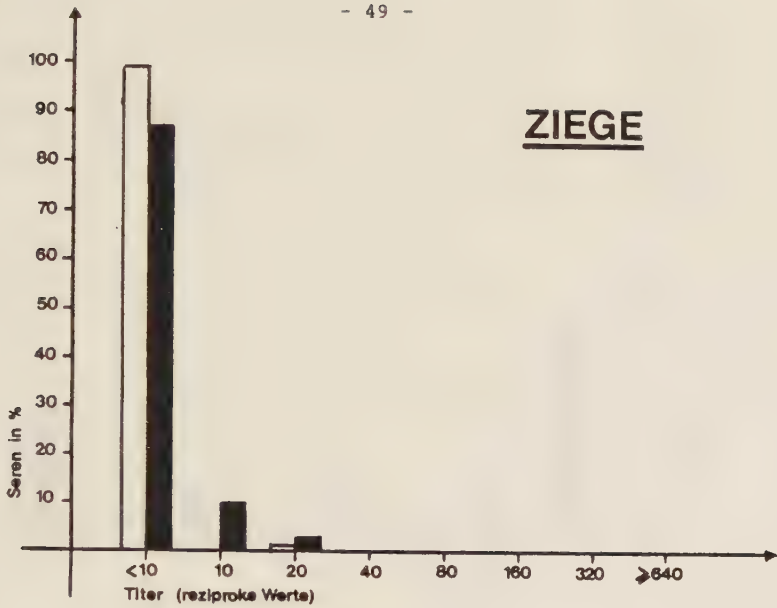


Abbildung 7: Fortsetzung

□ = HCV OC-43

■ = BCoV

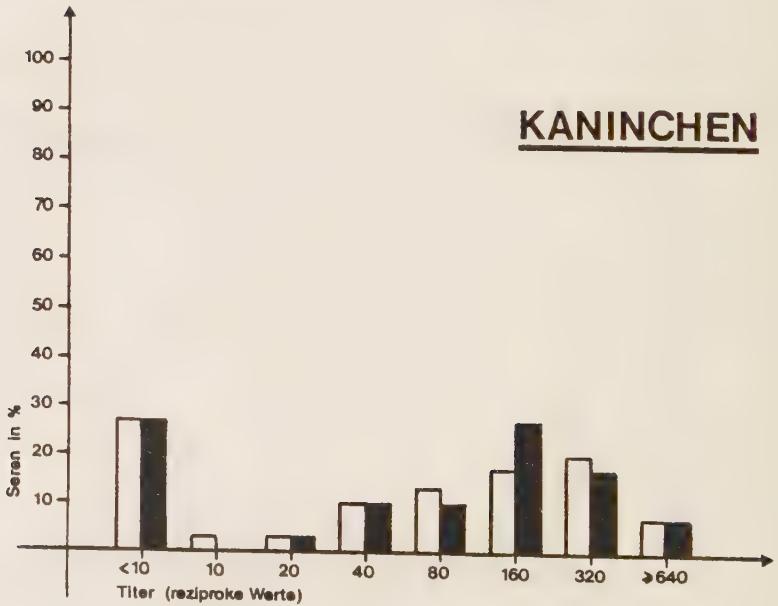
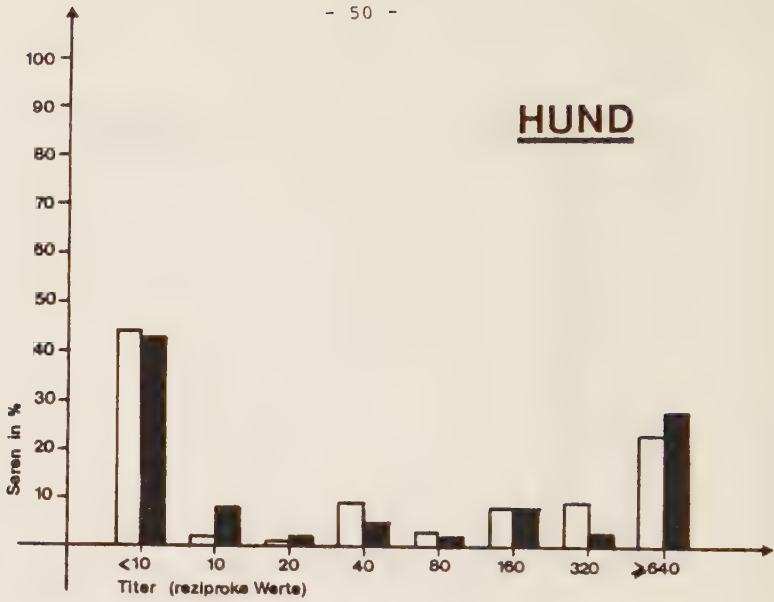


Abbildung 7: Fortsetzung

□ = HCV OC-43

■ = BCV

Tabelle 7: Vergleich der Titer neutralisierender Antikörper gegen HCV OC-43 und BCV in Humanseren verschiedener Einzugsbereiche.

Herkunft	Max-von Pettenkofer-Institut, München		Kempten	
Anzahl der Proben	91		99	
Antikörper-Titer	HCV OC-43	BCV	HCV OC-43	BCV
< 1:10	2	0	0	0
1:10	11	1	0	4
1:20	17	3	7	3
1:40	34	8	14	16
1:80	21	32	31	40
1:160	5	21	26	24
1:320	1	24	19	9
> 1:640	0	2	2	3

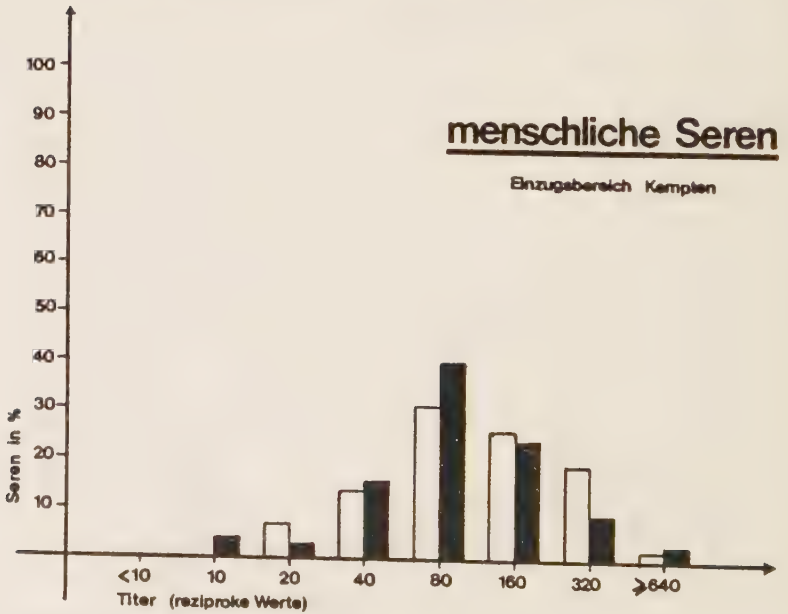
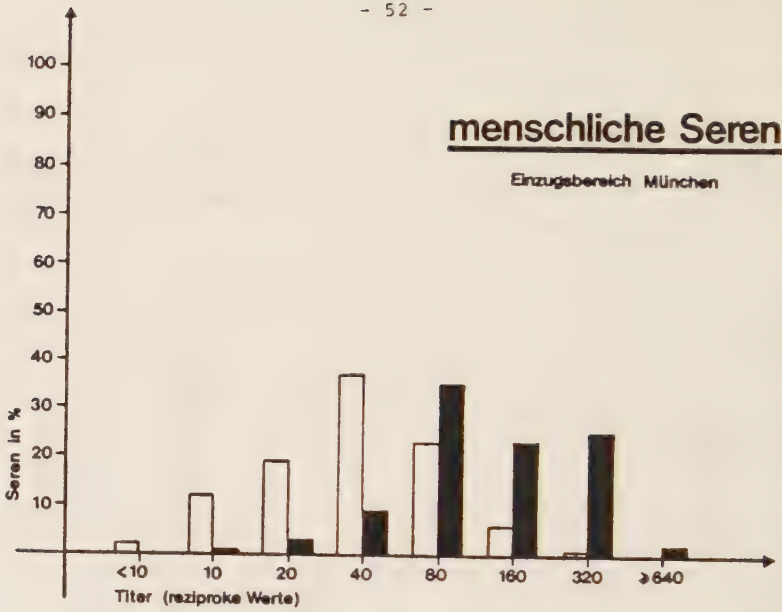


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Neutralisationstiter gegen HCV OC-43 und BCV, bezogen auf die Gesamtzahl der jeweils getesteten Seren.



= HCV OC-43



= BCV

Aus den graphischen Darstellungen konnte eine ähnliche prozentuale Verteilung der HCV OC-43- und der BCV-Antikörpertiter in den Seren der einzelnen Tierarten und der Menschen abgelesen werden. Um diesen Sachverhalt noch eingehender zu überprüfen, wurde die Korrelation zwischen den Antikörpertitern gegen beide Virusstämme in allen 1070 untersuchten Seren ermittelt. Der Korrelationskoeffizient ($r = 0,867$) bestätigte die gute Übereinstimmung. HCV OC-43-Antikörper und BCV-Antikörper ergaben in den jeweiligen Testsystemen entweder die gleichen Titer, oder divergierten um 1-3 Stufen nach oben oder nach unten. In 2% der Fälle wurden größere Abweichungen festgestellt.

In Abbildung 9 ist dieser Zusammenhang dargestellt.

2.8. Antigenetische Beziehung zwischen HCV OC-43 und BCV

Mit Hilfe der Kreuzneutralisation sollte der Verwandtschaftsgrad zwischen den beiden Virusstämmen beurteilt werden.

Hierzu wurden die hergestellten Ehrlich'schen Asziten verwendet, die Antikörper gegen HCV OC-43 enthielten. Außerdem stand ein Ehrlich'scher Aszites aus dem Jahre 1984 zur Verfügung, der Antikörper gegen HCV OC-43 aus der von Dr. Tyrrell stammenden Mäusegehirnsuspension enthielt. Ferner wurden das gegen HCV OC-43 hergestellte Meerschweinchen-Immunserum, zwei Meerschweinchen-Immunseren gegen BCV, sowie ein Mäuse-Immunserum gegen BCV eingesetzt. Zuletzt wurden für die Untersuchungen noch monoklonale Antikörper gegen BCV herangezogen, die ebenfalls als Mäuseaszites vorlagen.

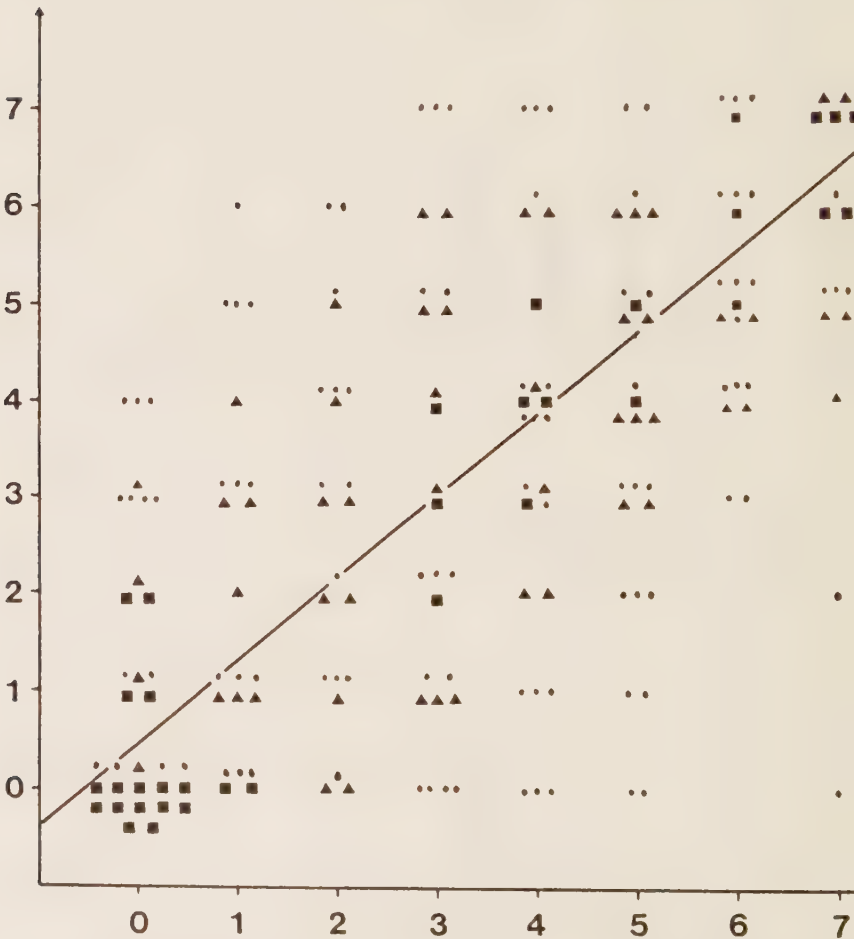
Als Antigene wurden HCV OC-43 der 11. Passage in der Verozellinie und BCV V270/83 der 14. Passage in fetalen, bovinen Lungenzellen, mit jeweils 100 KID₅₀/0,05 ml verwendet.

Die Neutralisationsteste wurden in der für HCV OC-43 beschriebenen Art mit $2,5 \times 10^5$ Verozellen/0,1 ml, bzw. 5×10^5 fetalen, bovinen Lungenzellen/0,1 ml durchgeführt.

Wie Tabelle 8 zeigt, wiesen die Ehrlich'schen Asziten homologe Antikörpertiter von 1:160 bzw. 1:1280 auf. Die heterologen Titer lagen um 3 bis 4 Stufen niedriger, zwischen 1:20 und 1:160.

Abbildung 9: Vergleich der neutralisierenden Antikörpertiter gegen HCV OC-43 und BCV in Seren verschiedener Spezies. Dargestellt sind die $10 \times \log_2$ -Werte der Endverdünnungen

BCV



$n = 1070$

$r = 0,867$

$y = 0,45 + 0,84x$

■ = 20 Wertepaare

▲ = 5 Wertepaare

● = 1 Wertepaar

Tabelle 8: Ergebnisse der Kreuzneutralisation mit anti-körperhaltigen Mäuseasziten und Immunseren gegen HCV OC-43 und BCV V270/83.
Dargestellt sind die reziproken Endwerte.

Asziten/Immunseren	Virus	
	HCV OC-43	BCV V270/83
HCV OC-43 Ehrl.-Aszites (1984)	1280	80
HCV OC-43 Ehrl.-Aszites (30.05.1985)	160	20
HCV OC-43 Ehrl.-Aszites (26.09.1985)	1280	160
HCV OC-43 Meersch.-IS (16.09.1985)	5120	2560
BCV V270/83 Mäuse-IS (24.06.1985)	640	2560
BCV V270/83 Meersch.-IS (29.02.1984)	1280	1280
BCV V270/83 Meersch.-IS (01.10.1985)	5120	5120
BCV V270/83 Mäuseaszites Klon I/1	8×10^6	8×10^6
BCV V270/83 Mäuseaszites Klon I/2	8×10^6	8×10^6

Bei den BCV-Meerschweinchen-Immunsereen waren homologe und heterologe Antikörpertiter identisch. Sie lagen bei 1:1280 bzw. 1:5120. Das HCV OC-43-Meerschweinchen-Immunsereum mit einem homologen Antikörpertiter von 1:5120 wies einen heterologen von 1:2560 auf. Das BCV-Mäuse-Immunsereum reagierte mit einem homologen Titer von 1:2560, der heterologe Titer lag um 2 Stufen niedriger bei 1:640. Bei den,monoklonale Antikörper gegen BCV enthaltenden Mäuseasziaten, war kein Unterschied zwischen homologen und heterologen Antikörpertitern festzustellen. Sie lagen bei 8×10^{-6} .

2.9. Versuche zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Die durchgeführten Fusionen waren durch sehr gutes Koloniewachstum gekennzeichnet. Nach 14 Tagen waren in 40% bis 60% der Mikroplattenlöcher eine oder mehrere Kolonien gewachsen. Alle Zellkulturüberstände von Hybridomazellen, die von Mäusen gewonnen wurden, die mit HCV OC-43 immunisiert worden waren, zeigten im Neutralisationstest und in der Hämagglutinationshemmungsreaktion keinerlei Aktivität.

Nach einer BCV-Fusion war ein Hybridoma-Zellkulturüberstand von 856 getesteten im Neutralisationstest positiv. Die Hämagglutinationshemmungsreaktion war negativ. Die Wiederholung der Tests nach einer Woche bestätigte diese Ergebnisse.

In dem entsprechenden Napf der Mikroplatte waren 3 Kolonien zu erkennen. Diese wurden daraufhin gepickt und auf 3 Löcher einer Linbroplatte verteilt. Eine dieser Kulturen (7G6-2) wies 14 Tage später einen NT-Titer von 1:10 auf. Diese Zellen wurden vermehrt und schließlich bei -120°C aufbewahrt.

4 Wochen nach dem Picken wurden Hybridomas aus einer 25 cm^2 -Zellkulturflasche mit der Limiting dilution-Technik kloniert. In allen der 6 Mikroplatten waren Vertiefungen zu finden, in denen eine oder mehrere Kolonien wuchsen. Die Zellkulturüberstände der 30 bewachsenen Näpfe wurden 14 Tage nach der Klonierung im NT getestet. Zwei der Näpfe, in denen nur eine Kolonie wuchs, wiesen NT-Titer von 1:320 auf. Bei allen anderen Löchern war keine neutralisierende Aktivität nachweisbar.

Die Zellen der beiden positiven Einzelkolonien wurden fortan als Klon BCV/I/1 und Klon BCV/I/2 bezeichnet und vermehrt. Von jedem Klon wurden mehrere Ampullen zu je 1,0 ml ($\approx 3,75 \times 10^5$ Zellen) tiefgefroren.

Außerdem wurden jeweils 1×10^6 Zellen eines jeden Klones in 3 BALB/c-Mäuse injiziert. Nach 12 Tagen konnten pro Maus bis zu 10 ml Aszites gewonnen werden.

Für den NT und die HAH wurde der Aszites 30 Minuten bei 56°C inaktiviert. Der festgestellte NT-Titer betrug $1:8 \times 10^6$, auch im Aszites konnte keine HAH-Aktivität nachgewiesen werden.

Von jedem Klon wurden aus Mäuseaszites Hybridomazellen in-vitro reisoliert. Die Mäusepassage der Zellen hatte einen deutlich positiven Effekt auf die Vitalität und das Wachstum dieser Zellen. Die Vermehrungsrate war entscheidend erhöht und auch bei sehr dichtem Zellrasen fanden sich im Überstand nur sehr wenige schwimmende Hybridomas.

Für 24 Stunden wurde eine solche dichte Zellkulturflasche nach einmaligem vorsichtigem Waschen des Zellrasens mit serumfreiem Medium beschickt. Nach Zentrifugation bei 2200g über 30 Minuten wies dieser antikörperhaltige Zellkulturüberstand einen NT-Titer von 1:160 auf. Die serumfreie Behandlung der Kulturen hinterließ aber sichtlich Spuren. Das Wachstum stagnierte, das morphologische Erscheinungsbild der Zellen war beeinträchtigt. Die Erholung erfolgte nur zögernd.

Die aus dem Aszites gewonnenen Hybridomazellen konnten auch zur Produktion von Aszites bei anderen Mäusen verwendet werden. Bei Aufnahme des Sedimentes in 3,0 ml Medium und Applikation von 1,0 ml/Maus lief die Aszitesproduktion rascher ab.

D. Besprechung der Ergebnisse

HCV OC-43 wurde zunächst aus einer Mäusegehirnsuspension auf der HRT-18-Zelllinie isoliert. Der HA-Titer des gefriergetauten, infizierten Zellkulturmaterials der 1. Passage betrug 1:8 bis 1:16. Ab der 2. Passage war keine Virusvermehrung mehr nachzuweisen.

Nach der intracerebralen Inokulation der Original-Gehirnsuspension und auch der HA-positiven HRT-18-Suspensionen in BALB/c-Babymäuse, wurde eine gute Vermehrung von HCV OC-43 erreicht. Im Anschluß an eine Inkubationszeit von 4-6 Tagen wiesen die gewonnenen 10%-igen Gehirnsuspensionen HA-Titer von 1:80 bis 1:1280 auf. Diese Gehirnsuspensionen stellten das Ausgangsmaterial für die Adaptierung von HCV OC-43 an verschiedene Zellkulturen dar.

Zu Beginn konnten nur bei stationären Verozellkulturen Hinweise auf eine Virusvermehrung festgestellt werden. Die bei 33°C und 37°C bebrüteten Kulturen entwickelten ab dem 4. Tag einen cpE, der in Umfangsvermehrung und Abkuglung der Zellen bestand. In den bei 33°C bebrüteten Kulturen folgte bis zum 7. Bebrütungstag der Abkuglung noch ca. 20% Zytolyse des Zellraums, das anschließend gefriergetaute Zellkulturmaterial hatte einen HA-Titer von 1:10. Bei den bei 37°C bebrüteten Zellkulturen war keine HA-Aktivität nachzuweisen. Ein besonderer Einfluß von Trypsin war nicht zu beobachten. In allen nachfolgenden Passagen konnten weder cpE, noch HA-Titer ermittelt werden. Die Adaptierungsversuche mit stationären, oder mit Rollerkulturen von HRT-18-Zellen, primären, humanen, fetalen Lungenzellen, BSC-1- und MA-104-Zellen müssen ebenso als negativ bewertet werden, wie die in Vero-Rollerkulturen.

Hierbei ist zu erwähnen, daß Brucková et al. (1970) HCV OC-43 erfolgreich an BSC-1-Rollerkulturen und Gerna et al. (1978) an verschiedene humane, fetale Lungenfibroblasten-Zellkulturen (z.B. MA321-Zellen) adaptieren konnten. In beiden Fällen wurden mit dem Virus zuvor allerdings einige Passagen in primären

Meerkatzen- bzw. Rhesusaffen-Nierenzellen durchgeführt. Die Adsorption des Inokulums erfolgte jeweils 60 Minuten bei 33°C, die Bebrütungstemperatur betrug ebenfalls 33°C. Gerna et al. (1982) beschrieben außerdem die Adaptierung von an humane, fetale Lungenfibroblasten adaptiertem HCV OC-43 an Verozellen, genauere Hinweise fehlen jedoch. Hogue et al. (1984) konnten HCV OC-43, wie auch einige BCV-Stämme ohne Schwierigkeiten in HRT-18-Zellen vermehren. Die Adsorption des Inokulums wurde 90 Minuten bei 37°C durchgeführt. Weitere Angaben werden allerdings nicht gemacht.

Diese Befunde, sowie die Ergebnisse aus den eigenen Adaptierungsversuchen dienten als Anlaß, das Adaptierungsverfahren in Zweifel zu stellen und in einigen Punkten abzuwandeln. Die neue Technik wurde bei Verozellen angewendet und HCV OC-43 konnte an diese Zelllinie kontinuierlich, mit ständig zunehmenden HA-Titern adaptiert werden. Entscheidend für den Erfolg könnten die 90-minütige Adsorptionszeit des Inokulums bei 37°C und die anschließende Bebrütung bei 33°C, sowie die geringeren Wasch- und Gefriertauvorgänge der Kulturen gerade in den ersten Passagen, und damit eine schonendere Behandlung, gewesen sein.

Nach einiger Zeit wurde eine gute Vermehrung auch bei 37°C erzielt, der ein relativ spät auftretender, aber gut ablesbarer cpE (Zellabkuglung und Lysis des Zellrasens) parallel lief. Mit dem neuen Verfahren wurde auch eine Vermehrung in HEL-Zellen erreicht. Der Grund für die Mißerfolge mit HRT-18-Zellen lag offenbar an den nicht optimalen Kulturbedingungen für diese Linie.

Die Verozellen eigneten sich sehr gut zur Virusvermehrung. Bei Verimpfung von $10^{6,43}$ KID₅₀/ml trat keine Einschnittvermehrung auf. Das erste Maximum des Infektiositätstiters wurde in der Zell- bzw. Mediumphase 48 bzw. 60 Stunden p. inf. erzielt, in der Gesamtvirusphase 96 Stunden p. inf. Dem Absinken der Infektiosität in allen drei Virusphasen folgte ein erneuter Titeranstieg. Da Einfachansätze verwendet wurden, lag die Infektiosität der Zellkulturfläschchen, die zur Titrierung des Gesamtvirus ver-

wendet wurden in einigen Fällen unter der Infektiosität der Fläschchen, die der Titrierung von Zell- und Mediumfraktion dienen.

Die HA-Aktivitäten von Gesamtvirus und Zellphase stiegen bis zur 72. Stunde p. inf., um eine Titerstufe versetzt, parallel an. Während die Gesamtvirusphase ihren relativ stabilen Maximalwert 96 Stunden p. inf. erreichte, fiel der Titer der Zellphase kontinuierlich ab. Gleichzeitig stieg die bis dahin sehr geringe HA-Aktivität der Mediumphase zwischen der 72. und 120. Stunde p. inf auf ihren Maximalwert. Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, daß sich der cpE erst relativ spät entwickelt und mit zunehmender Zeitdauer nach der Infektion zusätzlich infizierte Zellen in das Medium abgelöst werden.

Diese Ergebnisse sind mit solchen von anderen Autoren nur bedingt vergleichbar. Bucknall et al. (1972 a) ermittelten für HCV OC-43 in über 8 Tage bei 33°C bebrüteten WI38-Zellen mit der Hämadsorptionstechnik zwei Vermehrungszyklen. Die erste Virusvermehrung begann 13 Stunden p. inf. und dauerte bis ca. 24 Stunden p. inf. Im zweiten Zyklus wurden nach 5-6 Tagen mit ca. 10^7 KID₅₀/ml die höchsten Infektiositätstiter erzielt. Der cpE trat erst nach 5-6 Tagen auf. Gerna et al. (1979) stellten für HCV OC-43 in über 120 Stunden bei 33°C bebrüteten MA-321-Zellen eine Einschnittvermehrungskurve auf. Die maximalen Infektiositätstiter, sowie die parallel verlaufenden HA-Titer wurden 48-72 Stunden p. inf mit 10^7 - $10^{7,5}$ KID₅₀/ml, bzw. 1:256 bestimmt. Infektiosität und HA-Aktivität der Zellphase waren jeweils niedriger. Die Ausbildung des cpE begann 72-96 Stunden p.inf. Schmidt et al. (1979) untersuchten die Vermehrung von HCV OC-43 über 50 Stunden in zwei bei 33°C bebrüteten menschlichen Zelllinien in einem Plaquetest. In humanen, diploiden, fetalen Tonsillenzellen trat in der zellassozierten Phase 20 Stunden p. inf., in der Überstandsphase 32 Stunden p. inf. mit 5×10^7 PBE/ml die höchste Infektiosität auf. Erst 32 Stunden p. inf war eine geringgradige Ausbildung des cpE zu beobachten, mit dessen weiterer Entwicklung die Infektiosität wieder abfiel. In humanen heteroploiden Rhabdomyosarkomazellen

lag die maximale Infektiosität der zellgebundenen Phase 28 Stunden p. inf., die der Überstandsphase 42 Stunden p. inf. bei ca. 5×10^8 PBE/ml. Zu diesem Zeitpunkt war auch hier der cpE erst gering entwickelt. Der Plaquetest war etwa 10fach empfindlicher als die 50%-Endpunktmethode.

Das zellkulturadaptierte HCV OC-43 agglutiniert Erythrozyten von Ratten, Mäusen, Hühnern bei Temperaturen zwischen 4°C und 37°C und auch geringgradig menschliche Erythrozyten bei 4°C und 25°C. Meerschweinchen-, Pferde-, Rinder-, Schaf-, Ziegen-, Schweine- und Hundeerythrozyten wurden in keinem der untersuchten Temperaturbereiche agglutiniert. Diese Ergebnisse sind ähnlich denen von Kaye und Dowdle (1969). Sie fanden allerdings bei Ratten- und Mäuseerythrozyten bei 4°C um eine Titerstufe niedrigere Werte, als bei 25°C und 37°C. Außerdem reagierten Hühnererythrozyten in allen Temperaturbereichen und menschliche Erythrozyten der Blutgruppe "0" bei 4°C empfindlicher als in unseren Versuchen. In weiterführenden Untersuchungen stellten wir allerdings fest, daß ein auffälliger individueller Unterschied in der Reaktionsfähigkeit von Hühnererythrozyten verschiedener Herkunft besteht. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch Gerna et al. (1981) bei Untersuchungen über die hämagglutinierende Aktivität von HCV OC-43 und BCV. Sie berichten über eine relativ große Variationsbreite in der Agglutinationsempfindlichkeit von Erythrozyten verschiedener Spezies. So werden u.a. in 10% der Fälle menschliche Erythrozyten der Blutgruppe "0" nicht von HCV OC-43 agglutiniert.

Die HämadSORption von HCV OC-43 stellt nach Bucknall et al. (1972 a) eine sog. "PseudohämadSORption" dar, und kommt durch Reaktion der Erythrozyten mit aus der Zelle ausgeschleusten und an der äußeren Zellmembran haftenden neugebildeten Viruspartikeln zustande. Sie ist, wie Gerna et al. (1979) in anderem Zusammenhang erwähnen mit Vorsicht zu beurteilen. In unseren Untersuchungen stellte der HämadSORptionstest nur in deutlich positiven Fällen ein zusätzliches, sehr augenscheinliches Hilfsmittel zum Nachweis der Virusvermehrung dar. Als Beurteilungskriterium bei

Virustitrationen war die Hämadsorption allerdings nicht zu verwenden, da sie stets höhere Infektiositätstiter lieferte, als Ablesungen aufgrund des cpE und gerade in Grenzbereichen der Virusvermehrung das Ergebnis unklar war.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von gradientengereinigtem HCV OC-43-Zellkulturmaterial waren bei 40.000facher Vergrößerung Coronaviruspartikel mit ihren typischen morphologischen Charakteristika sehr deutlich zu erkennen.

Der Nachweis neutralisierender Antikörper gegen HCV OC-43 in menschlichen Seren und Seren verschiedener Tierarten wurde erstmals auf einfache Weise in einem Zellkultur-Neutralisationstest bei 37°C und durch Beurteilung des cpE geführt. Die relativ lange Bebrütungszeit von 7 Tagen wird dadurch gerechtfertigt, daß der Test ohne großen Aufwand durchzuführen und mit verlässlichen Ergebnissen abzulesen ist. Der Nachweis neutralisierender Antikörper gegen HCV OC-43 war in der Vergangenheit mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Der von Kapikian et al. (1972) auf einer Neutralisations-Hämadsorptions-Technik basierende Test wurde zuletzt, wegen seiner Umständlichkeit, Zeitaufwendigkeit und Unzuverlässigkeit arg kritisiert (Gerna et al., 1979). Gerna et al. (1979, 1980) entwickelten einen Mikroneutralisationstest und einen Plaque-Reduktions-Test mit MA-321-Zellen, die bei 33°C bebrütet wurden. Deren Vorteil liegt unbestreitbar darin, daß das Ergebnis innerhalb von 24 bis 48 Stunden ermittelt werden kann. Allerdings erfolgt der Nachweis neutralisierender Antikörper im ersten Fall über den Umweg der Hämagglutinationsfähigkeit des nicht neutralisierten Virusanteils, im zweiten Fall durch Färbung der Virusplaques mit der Immunperoxidase-Antikörper-Technik.

Die Ergebnisse der seroepizootiologischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, daß beim Menschen mit 93%, Pferden mit 63%, Rindern mit 99%, Schweinen mit 61%, Hunden mit 53% und Kaninchen mit 70% ein hoher Prozentsatz der Seren Antikörpertiter gegen HCV OC-43 von 1:20 bis 1:640 aufwies. In diesem Titerbereich lagen nur 24% der untersuchten Schafseren. Daß es sich hierbei um

spezifische Antikörper handelt und nicht um Inhibitoren (Hovi, 1978; Gerna et al., 1980), zeigt das Ergebnis der Untersuchung von Ziegenserum, bei denen in 92 Seren mit einer Ausnahme Titer von $<1:10$ festgestellt wurden.

Vergleichbare Untersuchungen waren bisher nur mit menschlichen Seren durchgeführt worden. Hovi et al. (1979) berichteten, daß in Finnland ab dem 6. Lebensjahr in fast allen untersuchten Seren Antikörper gegen HCV OC-43 nachzuweisen waren. Die dort ermittelten Antikörpertiter sind mit den vorliegenden Ergebnissen nicht direkt zu vergleichen, da Testsysteme unterschiedlicher Spezifität verwendet wurden. Die Maximaltiter betrugen in der HAH 1:80, in der KBR 1:32 und im Radio-Immunassay 1:800, während in dieser Untersuchung die höchsten Titer $>1:640$ waren. Wichtig waren die Ergebnisse der epizootiologischen Untersuchung über das Vorkommen von HCV OC-43-Antikörpern aber für einen Vergleich mit der Antikörperverteilung gegen das sehr nah verwandte bovine Coronavirus (BCV), die Lu (1985) bei den gleichen Seren ebenfalls in einem Zellkultur-Neutralisationstest ermittelt hatte. Aus Untersuchungen an kleinen Zahlen von Seren (Mebus et al., 1973; Sato et al., 1980) war nämlich bekannt, daß Antikörper gegen BCV sowohl beim Menschen, als auch bei verschiedenen Tierspezies vorkommen. Storz und Rott (1980) erwähnten nach der Untersuchung einer großen Zahl von menschlichen Seren die Möglichkeit, daß BCV ein Zoonoseerreger ist. Gerna et al. (1981) wiesen bei menschlichen und bei Kälberserumproben im Neutralisationstest weitgehend identische, oder sich um maximal zwei Stufen unterscheidende HCV OC-43- bzw. BCV-Antikörpertiter nach. Lu (1985) ermittelte in einer vorausgegangenen Dissertation die Verbreitung von BCV-Antikörpern in Seren verschiedener Spezies. Demnach müßten BCV-Infektionen auch beim Menschen sehr weit verbreitet sein. Aus der graphischen Darstellung der für HCV OC-43 und BCV ermittelten prozentualen Anteile der Antikörpertiter ließ sich eine ähnliche Verteilung innerhalb der untersuchten Seren ablesen. Dabei wiesen die Humanseren aus dem Einzugsbereich der Stadt München durchschnittlich um eine Stufe niedrigere HCV OC-43-Antikörpertiter auf, als solche aus dem Ein-

zugsbereich der Stadt Kempten, während die Verteilung der BCV-Antikörpertiter kaum einen Unterschied zeigte. Genauere Aussagen lassen sich durch die Bestimmung der Korrelation zwischen den HCV OC-43- und BCV-Antikörpertitern in allen 1070 untersuchten Seren treffen. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung ($r=0,867$). Die Titer waren entweder gleich, oder sie divergierten um 1 bis 3 Stufen, entweder nach oben, oder nach unten. In ca. 2% der Fälle wurden größere Abweichungen festgestellt, was sicher mit an der Tatsache liegt, daß die Neutralisationsteste mit unterschiedlicher Technik und von verschiedenen Untersuchern durchgeführt wurden. Die gute Korrelation von HCV OC-43- und BCV-Antikörpertitern kann zum einen mit der engen Antigenverwandtschaft zwischen beiden Virusstämmen in Zusammenhang gebracht werden, zum anderen aber auch für die Infektion heterologer Spezies mit HCV OC-43 und BCV sprechen, wie sie auch Hogue et al. (1984) vermuten. Auch Mischinfektionen mit beiden Stämmen sind in diesem Fall denkbar. Dies würde das Auftreten von HCV OC-43 und BCV-Antikörpern bei Spezies erklären, bei denen Coronaviren entweder nicht beschrieben sind (Schaf), oder aber Coronaviren der antigenen Gruppe I nicht vorkommen (Pferd, Hund, Kaninchen). Zink (1985) konnte in einer ebenfalls vorausgegangenen Dissertation zeigen, daß die, von ihm in den gleichen Seren nachgewiesenen Antikörpertiter gegen HEV 67N und MHV-A59, nicht mit den von Lu (1985) gefundenen BCV-Antikörpern korrelierten. Die Einbeziehung von HCV OC-43 in diese epizootiologischen Studien konnte zwar zusätzliche Einblicke bringen, aber der Problembereich der Bedeutung von BCV als Zoonoseerreger bleibt in Anbetracht der Antikörperkorrelation mit HCV OC-43 weiter offen. Die sehr enge Antigenverwandtschaft des humanen, enteralen Coronavirus mit BCV (Vautherot und Laporte, 1983) oder mit HCV OC-43 (Gerna et al., 1984) erschweren die Problematik zusätzlich. Bei vorsichtiger Interpretation könnte auch ein bisher unbekanntes Coronavirus mit identischen antigenen Determinanten für die Herkunft der ermittelten Antikörpertiter verantwortlich sein. Die Epizootiologie bzw. Epidemiologie von HCV OC-43 und BCV wird sich in Zukunft serologisch, aufgrund bestehender Antigenunter-

schiede kaum zufriedenstellend untersuchen lassen. Hogue et al. (1984) schlagen daher z.B. Immunoblotting und Oligonukleotid-Fingerprinting als geeignetere Techniken vor. Sie unterscheiden HCV OC-43 und BCV durch ein unterschiedliches elektrophoretisches Verhalten des Glykoproteins von 190.000 Daltons, aufgrund des Anteils des Glykoproteins von 140.000 Daltons und anhand einer leichten Differenz im Molekulargewicht des internen Phosphoproteins. Diese Unterschiede sollen sich aus einer 4%-igen Differenz in den Nukleotidsequenzen der beiden Virusstämme herleiten, wie sie von Lapps und Brian (1985) beschrieben wurde. Diese Autoren vertreten aufgrund ihrer Ergebnisse mit Hilfe der T₁-Oligonukleotid-Fingerprinting-Technik die Auffassung, daß es bei BCV und HCV OC-43 um zwei verschiedene Virusstämme handelt.

In einem Kreuzneutralisationstest wurde die in den epizootiologischen Untersuchungen festgestellte Korrelation zwischen HCV OC-43 und BCV-Antikörpertitern überprüft. HCV OC-43-Ehrlich'sche Mäuseaziten wiesen 3 - 4 Stufen höhere homologe Antikörpertiter auf. Ein HCV OC-43-Meerschweinchen-Immunserum hatte einen um 1 Stufe, ein BCV-Mäuse-Immunserum einen um 2 Stufen höheren homologen Antikörpertiter, während bei zwei BCV-Meerschweinchen-Immunseren kein Unterschied zwischen homologen und heterologen Antikörpertitern festzustellen war. Gerna et al. (1981) ermittelten in der HAH und im NT mit monospezifischen Mäuseimmunseren eine weniger enge antigene Verwandtschaft zwischen HCV OC-43 und BCV, als mit Seren der natürlichen Wirte, die nach der Immunisierung mit den entsprechenden Stämmen gewonnen wurden. Sie schließen daraus, daß der Grad der Antikörperspezifität von der untersuchten Spezies abhängt. Auch das Immunisierungsverfahren könnte eine Rolle spielen. Daraus ließe sich ebenfalls die mit Meerschweinchen-Immunseren festgestellte, sehr enge Antigenverwandtschaft zwischen HCV OC-43 und BCV erklären, und stellt den Wert solcher Immunseren, zumindest für Untersuchungen mit den beiden Virusstämmen in Frage. Zum anderen könnten aber auch hierfür heterologe Infektionen verantwortlich gewesen sein, da die immunisierten Tiere in räumlich

geringer Entfernung gehalten wurden.

Die antigenetischen Vergleichsuntersuchungen wurden durch den Einsatz monoklonaler Antikörper vervollständigt. Fusionen, die der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen HCV OC-43 dienen sollten, verliefen negativ. Aus einer BCV-Fusion konnten die beiden Klone BCV/I/1 und BCV/I/2 gewonnen und weiter vermehrt werden. Diese wiesen hohe neutralisierende, dagegen keine hämagglutinationshemmende Aktivität auf. Die als Mäuseasziten vorliegenden monoklonalen Antikörper neutralisierten HCV OC-43 und BCV jeweils mit Titern von $1:8 \times 10^6$. Dies zeigt die Existenz gemeinsamer antigener Determinanten. Vautherot und Laporte (1983) zeigten mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Technik aber auch, daß einige gegen BCV gerichtete monoklonale Antikörper mit HCV OC-43 nicht reagierten. Weitere Untersuchungen mit dem Einsatz einer Vielzahl verschiedener Klone sind deshalb nötig, um beide Virusstämme eingehender charakterisieren zu können.

E. Zusammenfassung

HCV OC-43 konnte aus einer Mäuse-Gehirnsuspension in HRT-18-Zellen isoliert werden, aber nach erneuter Babymauspassage zunächst nicht an HRT-18-Zellen, primäre, humane, embryonale Lungenzellen, Vero-, BSC-1-, oder MA-104-Zellen adaptiert werden. Erst nach Änderung der Technik vermehrte sich das Virus mit langsam ansteigenden HA-Titern in Verozellkulturen, zunächst bei 33°C, später auch bei 37°C. Die Virusvermehrung verlief rasch, ihr folgte frühestens 60 Stunden p. inf. ein cpE, der in Deformierung und Abkugelung der Zellen, sowie Lysis des Zellrasens bestand.

Der zellkulturadaptierte Virusstamm besaß hämagglutinierende Aktivität, besonders für Ratten- und Mäuseerythrozyten, daneben aber auch für Hühnererythrozyten und menschliche Erythrozyten der Blutgruppe "0". Meerschweinchen-, Pferde-, Rinder-, Schaf-, Ziegen-, Schweine- und Hundeerythrozyten wurden nicht agglutiniert.

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von zellkulturadaptiertem HCV OC-43, waren die typischen Coronaviruspartikel besonders gut zu erkennen.

Neutralisierende Antikörpertiter gegen HCV OC-43 von 1:20 bis $\geq$ 1:640 wurden in 177 von 190 menschlichen Seren (93%), 83 von 131 Pferdeseren (63%), 144 von 145 Rinderseren (99,3%), 48 von 200 Schafseren (24%), 118 von 194 Schweineseren (61%), 47 von 88 Hundeseren (53,4%) und 21 von 30 Kaninchenserem (70%) nachgewiesen. Alle untersuchten Ziegenserem waren mit einer Ausnahme negativ.

Der Vergleich dieser Ergebnisse, mit der für die gleichen Seren ermittelten BCV-Antikörperverteilung, ergab eine gute Korrelation zwischen HCV OC-43- und BCV-Antikörpertitern und eine ähnliche Verbreitung in den einzelnen Populationen.

Bei serologischen Vergleichsuntersuchungen in einem Kreuzneutralisationstest mit antikörperhaltigen Mäuseasziten und Mäuse- bzw. Meerschweinchen-Immunsereen, wiesen HCV OC-43 und BCV eine

sehr enge antigene Beziehung auf.

Fusionen zur Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen HCV OC-43 verliefen negativ. Nach einer BCV-Fusion wurden die beiden Klone BCV/I/1 und BCV/I/2 vermehrt. Sie wiesen neutralisierende Aktivität auf, aber keine hämagglutinationshemmende.

Summary

Adaptation of HCV OC-43 in Cellculture and The Epizootological Relevance

HCV OC-43 could be isolated from suckling mouse brain suspension in HRT-18-cells. After virus propagation in babymouse brain, the adaptation to HRT-18-cells, primary human fetal lung cells, BSC-1- and MA-104-cells was unsuccessful. However virus replication could be achieved in Vero cellcultures with slowly increasing HA-titers. Initially the cells were incubated at 33°C, later also at 37°C. Virus replication started quickly, but cpE was seen not earlier than 60 hours p. inf. It was characterized by deformation and rounding of cells, as well as lysis of the cellmonolayer.

The cellculture-adapted virus strain showed hemagglutinating activity particular for erythrocytes of rats and mice, and with lesser degree also for such of chicken and man (blood group "0"). Erythrocytes of guineapig, horse, cattle, sheep, goat, swine and dog were negative.

Electron microscopic studies of cellculture grown HCV OC-43 revealed typical coronavirus-particles.

Neutralizing antibody-titers against HCV OC-43 in the range of 1:20 - >1:640 were demonstrated in 177 of 190 human sera (93%), 83 of 131 horse sera (63%), 144 of 145 cattle sera (99,3%), 48 of 200 sheep sera (24%), 118 of 194 swine sera (61%), 47 of 88 dog sera (53,4%) and 21 of 30 rabbit sera (70%). 92 goat sera, with the exception of one, were found to be negative.

The comparison of this results, with the BCV-antibody distribution in the identical sera, determined a close correlation, as well as a similar dissemination in the respective population.

In a cross-neutralizationtest with immune sera of mice, guineapigs and specific antibodies containing ascites fluids of mice, the tight antigenic relationship between HCV OC-43 and BCV was confirmed.

Trials to produce monoclonal antibodies against HCV OC-43 failed. One BCV-fusion was followed by the growth of hybridomacells. Clones BCV/I/1 and BCV/I/2 were cultivated. They were shown to possess high neutralizing, but no hemagglutinating activity.

F. Literaturverzeichnis

- Bingham, R.W., J.D. Almeida, 1977:
Studies on the structure of a coronavirus-avian infectious
bronchitis virus.
J. Gen. Virol. 36, 495-502
- Bradburne, A.F., 1970:
Antigenic relationships amongst coronaviruses.
Arch. Ges. Virusforsch. 31, 352-364
- Brodeur, B.R., Tsang, Y. Larosese, 1984:
Parameters affecting ascites tumor formation in mice
and monoclonal antibody production
J. Immun. Meth. 71, 265-272
- Brucková M., K. McIntosh, A. Kapikian, R. Chanock, 1970:
The adaptation of two human coronavirus strains
(OC-38 and OC-43) to growth in cell monolayers.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 431-435
- Bucknall, R.A., A.R. Kalica, R.M. Chanock, 1972a:
Intracellular development and mechanism of hemadsorption
of a human coronavirus, OC-43
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 811-817
- Bucknall, R.A., L.M. King, A. Kapikian, R.M. Chanock, 1972b:
Studies with human coronaviruses II. Some properties of
strains 229E and OC-43.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 722-727
- Caul, E.O., W.K. Power, S.K.R. Clarke, 1975:
Coronavirus particles in faeces from patients with
gastroenteritis.
Lancet I, 1192
- Caul, E.O., S.K.R. Clarke, 1975:
Coronaviruses propagated from patient with non bacterial
gastroenteritis.
Lancet II, 853-854
- Caul, E.O., S.I. Egglestone, 1977:
Further studies on human enteric coronaviruses.
Arch. Virol. 54, 107-117

Gerdes, J.C., L.D. Jankovsky, B.L. De Vald, I. Klein,

J.S. Burks, 1981a:

Antigenic relationships of coronaviruses detectable by plaque neutralisation, competitive enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation.

In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds)

Biochemistry and Biology of Coronaviruses, Plenum Press, New York, 29-42

Gerdes, J.C., I. Klein, B. De Vald, J.S. Burks, 1981b:

Coronavirus isolates SK and SD from multiple sclerosis patients are serologically related to murine coronaviruses A59 and JHM and human coronavirus OC-43, but not to human coronavirus 229E.

J. Virol. 38, 231-238

Gerna, G., P.M. Cereda, M.G. Revello, M. Torsellini Gerna,

J. Costa, 1979:

A rapid microneutralisation test for antibody determination and serodiagnosis of human coronavirus OC-43 infections.

Microbiologica 2, 331-344

Gerna, G., E. Cattaneo, P.M. Cereda, M.G. Revello, G. Achilli
1980:

Human coronavirus OC-43 serum inhibitor and neutralizing antibody by a new plaque-reduction assay.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 163, 360-366

Gerna, G., P.M. Cereda, M.G. Revello, E. Cattaneo, M. Battaglia,
M. Torsellini Gerna, 1981:

Antigenic and biological relationships between human coronavirus OC-43 and neonatal calf diarrhea coronavirus.

J. Gen. Virol. 54, 91-102

Gerna, G., M. Battaglia, P.M. Cereda, N. Passarani, 1982:

Reactivity of human coronavirus OC-43 and neonatal calf diarrhea coronavirus membrane-associated antigens.

J. Gen. Virol. 60, 385-390

- Gerna, G., N. Passarani, P.M. Cereda, M. Battaglia, 1984:
Antigenic relatedness of human enteric coronavirus strains to human coronavirus OC-43: A preliminary report.
J. Infect. Dis. 150, 618-619
- Hamre, D., J. Procknow, 1966:
A new virus isolated from the human respiratory tract.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 190-193
- Hierholzer, J.C., E.I. Palmer, S.G. Whitefield, H.S. Kaye, W.R. Dowdle, 1972:
Protein composition of coronavirus OC-43.
Virology 48, 516-527
- Hogue, B., B. King, D. Brian, 1984:
Antigenic relationships among proteins of bovine coronavirus, human respiratory coronavirus OC-43 and mouse hepatitis coronavirus A59.
J. Virol. 51, 384-388
- Hovi, T., 1978:
Nonspecific inhibitors of coronavirus OC-43 hemagglutination in human sera.
Med. Microbiol. Immunol. 166, 173-176
- Hovi, T., H. Kainulainen, B. Ziola, A. Salmi, 1979:
OC-43 strain-related coronavirus antibodies in different age groups.
J. Med. Virol. 3, 313-320
- Kapikian, A.Z., H.D. James, S.J. Kelly, L.M. King, A.L. Vaughan, R.M. Chanock, 1972:
Hemadsorption by coronavirus strain OC-43.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 179-186
- Kapikian, A.Z., H.D. James, S.J. Kelly, A.L. Vaughan, 1973:
Detection of coronavirus strain 692 by immune electron microscopy.
Infect. Immun. 7, 111

- Kaye, H.S., W.R. Dowdle, 1969:
Some characteristics of hemagglutination of certain strains of "IBV-like" viruses.
J. Inf. Dis. 13, 120, 576-581
- Kaye, H.S., J.C. Hierholzer, W.R. Dowdle, 1970:
Purification and further characterisation of an "IBV-like" virus (coronavirus).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 457-463
- Kaye, H.S., H.B. Marsh, W.R. Dowdle, 1971:
Seroepidemiologic survey of coronavirus (strain OC-43) related infection in a children's population.
Am. J. Epidemiol. 94, 43-49
- Kaye, H.S., W.B. Yarbrough, C.J. Reed, A.K. Harrison, 1977:
Strain OC-43 and hemagglutinating encephalomyelitis virus strain 67N of swine: antibody responses in human and animal sera.
J. Infect. Dis. 135, 201-209
- Laporte, J., P. Bobulesco, 1981:
Growth of human and canine enteric coronaviruses in a highly susceptible cell line - HRT-18.
In: Pollard, M. (ed.), Perspectives in Virology, Vol. XI, 183-189. New York: Alan R. Liss
- Lapps, W., D.A. Brian, 1985:
Oligonucleotide fingerprints of antigenically related bovine coronavirus and human coronavirus OC-43.
Arch. Virol. 86, 101-108
- Lu, C., 1985:
Isolierung, Charakterisierung und Epidemiologie boviner Coronaviren.
Vet. Med. Diss., München
- Macnaughton, M.R., H.A. Davis, 1981:
Human enteric coronaviruses.
Arch. Virol. 70, 301-313

- Macnaughton, M.R., M. Madge, S. Reed, 1981:
Two antigenic groups of human coronaviruses detected by
using enzyme-linked immunosorbent assay.
Infect. Immun. 33, 734-737
- Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann, 1974:
Virologische Arbeitsmethoden. Bd. 1: Zellkulturen, Be-
brütete Hühnereier, Versuchstiere.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- McIntosh, K., J.H. Dees, W.B. Becker, A.Z. Kapikian,
R. M. Chanock, 1967a:
Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses
from patients with respiratory disease.
Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 933
- McIntosh, K., W.B. Becker, R.M. Chanock, 1967b:
Growth in suckling mouse brain of "IBV-like" viruses
from patients with upper respiratory tract disease.
Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 58, 2268
- McIntosh, K., A.Z. Kapikian, K.A. Hardison, J.W. Hartley,
R.M. Chanock, 1969:
Antigenic relationships among the coronaviruses of man
and between human and animal coronaviruses.
J. Immunol. 102, 1109-1118
- McIntosh, K., R.K. Chao, H.E. Krause, R. Wasil, H.E. Mocega,
M.A. Mufson, 1974:
Coronavirus infection in acute lower respiratory tract
disease of infants.
J. Infect. Dis. 130, 502-507
- Mebus C.A., E.L. Stair, M.B. Rhodes, M. J. Twiehaus, 1973:
Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation and
characteristics of a coronavirus-like agent.
Amer. J. Vet. Res. 34, 145-150

Monto, A.S., L.M. Rhodes, 1977:

Detection of coronavirus infection of man by immunofluorescence.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, 143-148

Pearson, J., C.A. Mims, 1985:

Differential susceptibility of cultured neural cells to the human coronavirus OC-43.

J. Virol. 53, 1016-1019

Pedersen, N.C., J. Ward, W.L. Mengeling, 1979:

Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronaviruses of other species.

Arch. Virol. 58, 45-53

Pensaert, M., P. Callebaut, 1978:

The coronaviruses: clinical and structural aspects with some practical implications.

Ann. Méd. Vét. 122, 301-322

Pokorný, J., M. Brucková, M. Rýc, 1975:

Biophysical properties of coronavirus strain OC-43.

Acta Virol. 19, 137-142

Robb, J.A., C.W. Bond, 1979:

Coronaviridae

In: Comprehensive Virology, Fraenkel-Conrat, H, Wagner, R.R. (eds) Plenum Press, New York, 193-247

Sarateanu, D.E., W. Ehrengut, 1975:

Serological study of coronavirus-antibodies in Hamburg. Immunität und Infektion 3, 86-88

Sato, K., Y. Inaba, Y. Miura, S. Tokuhisa, H. Akashi, T. Shinozaki, M. Matumoto, 1981:

Neutralizing antibody to calf diarrhea coronavirus in various animal species in Japan.

Microbiol. Immunol. 25, 623-625

- Schmidt, O.W., M.K. Cooney, G.E. Kenny, 1979:
Plaque assay and improved yield of human coronaviruses
in the human rhabdomyosarcoma cell line.
J. Clin. Microbiol. 9, 722-728
- Schmidt, O.W., G. Kenny, 1981:
Immunogenicity and antigenicity of human coronaviruses
229E and OC-43.
Infect. Immun. 32, 1000-1006
- Schmidt, O.W., G. Kenny, 1982:
Polypeptides and functions of antigens from human corona-
viruses 229E and OC-43.
Infect. Immun. 35, 515-522
- Schmidt, O.W., 1984:
Antigenic characterization of human coronaviruses 229E
and OC-43 by enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Clin. Microbiol. 20 (2), 175-180
- Sidell, St., H. Wege, V. ter Meulen, 1982:
The structure and replication of coronaviruses.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 99, 131-163
- Storz, J., R. Rott, 1981:
Reactivity of antibodies in human serum with antigens of
an enteropathogenic bovine coronavirus.
Med. Microbiol. Immunol. 169, 169-178
- Tappert, H., 1981:
Versuche zur Produktion von monoklonalen Antikörpern
gegen Rotaviren.
Vet. Med. Diss. München
- Tyrrell, D.A.J., M.L. Bynoe, 1965:
Cultivation of a novel type of common cold virus in
organ cultures.
Brit. Med. J. 1, 1467

Tyrrell, D.A.J., D.J. Alexander, J.D. Almeida, C.H. Cunningham,
B.C. Easterday, D.J. Garwes, J.C. Hierholzer, A. Kapikian,
M.R. Macnaughton, K. McIntosh, 1978:

Coronaviridae: second report

Intervirology 10, 321-328

Vautherot, J.F., J. Laporte, 1983:

Utilization of monoclonal antibodies for antigenic
characterization of coronaviruses.

Ann. Rech. Vét. 14 (4), 437-444

Zink, R., 1985:

Vorkommen von Antikörpern gegen Hämagglutinierendes
Encephalomyelitis-Virus und Mäuse-Hepatitis-Virus bei
verschiedenen Spezies.

Vet. Med. Diss., München

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Themas.

Besonders in Erinnerung behalten möchte ich Herrn Prof. Dr. P.A. Bachmann, der durch seinen jederzeit gewährten Rat und seine bereitwillige Unterstützung in der kurzen verbliebenen Zeit, viel zum Gelingen der Bearbeitung des Themas beigetragen hat.

Herrn Dr. W. Eichhorn danke ich für das Interesse und die vielen Hinweise bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Dr. P. Hübert, Herrn Dr. H. Meyer und allen Mitarbeitern der Isolierabteilung danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Unterstützung.

Lebenslauf

Am 8. April 1959 wurde ich, Claus-Peter Czerny, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Klaus Czerny und seiner Ehefrau Renate, geb. Otzick, in Straubing geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule (1965-1969) in Straubing, trat ich auf das Ludwigs-Gymnasium über, an dem ich im Juni 1978 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im Wintersemester 1979/80 mit meinem Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Am 15. November 1984 schloß ich das Staatsexamen ab.

Im Dezember 1984 begann ich mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation.

Mit Geltung vom 18. Januar 1985 wurde mir die Approbation als Tierarzt erteilt.

Seit August 1984 bin ich verheiratet, seit Januar 1985 habe ich einen Sohn.

